

(19) 【発行国】 日本国特許庁 ( J P )

【公報種別】 再公表特許 ( A 1 )

(11) 【国際公開番号】 WO 97 / 1 1 0 9 1

【発行日】 平成 1 1 年 ( 1 9 9 9 ) 9 月 7 日

(54) 【発明の名称】 新規ペプチド化合物およびその医薬組成物

(51) 【国際特許分類第6版】 C07K 5/062  
 14/705 14/71  
 5 A61K 38/03 38/17  
 38/06 38/17  
 G01N 33/68

【審査請求】 未請求

【予備審査請求】 有

【全頁数】 1 2 7

【出願番号】 特願平 9 - 5 1 2 5 9 8

(21) 【国際出願番号】 P C T / J P 9 6 / 0 2 6 9 7

(22) 【国際出願日】 平成 8 年 ( 1 9 9 6 ) 9 月 1 9 日

(43) 【国際公開日】 平成 9 年 ( 1 9 9 7 ) 3 月 2 7 日

(31) 【優先権主張番号】 特願平 7 - 2 4 0 3 0 1

(32) 【優先日】 平 7 ( 1 9 9 5 ) 9 月 1 9 日

(33) 【優先権主張国】 日本 ( J P )

(31) 【優先権主張番号】 特願平 7 - 3 5 2 0 3 8

(32) 【優先日】 平 7 ( 1 9 9 5 ) 1 2 月 2 7 日

(33) 【優先権主張国】 日本 ( J P )

(31) 【優先権主張番号】 特願平 8 - 2 1 0 5 2 8

(32) 【優先日】 平 8 ( 1 9 9 6 ) 7 月 2 2 日

(19) [Publication Office] Japanese Patent Office (JP)

[Kind of Document] Japanese Republished Patent Publication (A1)

(11) [International Publication Number] WO 97/ 110 91

[Publication Date] 1999.(1999) September 7 day

(54) [Title of Invention] NOVEL PEPTIDE COMPOUND AND ITS PHARMACEUTICAL COMPOSITION

(51) [International Patent Classification 6th Edition] C07K 5 /062 14/705 14/715  
 A61K 38/03 38/06 38/17  
 G01N 33/68

[Request for Examination] Examination not requested

[Provisional Request for Examination] Examination requested

[Number of Pages in Document] 127

[Domestic Application Number] Japan Patent Application Hei 9 - 512598

(21) [International Application Number] PCT /JP96/02697

(22) [International Application Date] 1996 (1996) September 19 day

(43) [International Publication Date] 1997 (1997) March 27 day

(31) [Priority Application Number] Japan Patent Application Hei 7 - 240301

(32) [Priority Date] Flat 7(1995) September 19 day

(33) [Priority Country] Japan (JP)

(31) [Priority Application Number] Japan Patent Application Hei 7 - 352038

(32) [Priority Date] Flat 7(1995) December 27 day

(33) [Priority Country] Japan (JP)

(31) [Priority Application Number] Japan Patent Application Hei 8 - 210528

(32) [Priority Date] 1996 (1996) July 22 day

(33) 【優先権主張国】 日本 (JP)

(81) 【指定国】 EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(71) 【出願人】

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【住所又は居所】 東京都中央区新川2丁目10番1号

(72) 【発明者】

【氏名】 片岡 之郎

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社医薬探索研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】 西島羽 剛

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社医薬探索研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】 高橋 基夫

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社医薬探索研究所内

(72) 【発明者】

【氏名】 澤 英治

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社医薬探索研究所内

(33) [Priority Country] (JP)

(81) [Designated States] EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, U.S. Patent, UZ, VN

(71) [Applicant]

[Name] KIRIN BREWERY CO., LTD.

[Address] Tokyo Chuo-ku Arakawa 2-10 1 number

(72) [Inventor]

[Name] Tsukasa Kataoka Itaru

[Address] Inside of Gumma Prefecture Takasaki City Miyahara town No. 3 Kirin Brewery Co., Ltd. pharmaceutical exploratory research place

(72) [Inventor]

[Name] West Toba hardness

[Address] Inside of Gumma Prefecture Takasaki City Miyahara town No. 3 Kirin Brewery Co., Ltd. pharmaceutical exploratory research place

(72) [Inventor]

[Name] Takahashi Motoo

[Address] Inside of Gumma Prefecture Takasaki City Miyahara town No. 3 Kirin Brewery Co., Ltd. pharmaceutical exploratory research place

(72) [Inventor]

[Name] Sawa Hideharu

[Address] Inside of Gumma Prefecture Takasaki City Miyahara town No. 3 Kirin Brewery Co., Ltd. pharmaceutical exploratory research place

(72) 【発明者】

【氏名】上正原 勝

【住所又は居所】群馬県高崎市宮原町3番地 麒麟麦酒株式会社医薬探索研究所内

(74) 【代理人】

【弁理士】

【氏名又は名称】佐藤 一雄

(57) 【要約】本発明は、細胞内カルボキシ末端のアミノ酸配列が $-A_1-A_2-A_3$ である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、少なくとも3個のアミノ酸配列を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ （式中、 $X=A_1$ もしくは $A_1$ と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは $A_3$ と同一分類に属するアミノ酸）のカルボキシ末端配列を有する新規ペプチド、その生物学的安定性、細胞膜透過性、あるいは上記調節活性が向上された該ペプチドの誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩、並びにこれら化合物を含む医薬組成物、またこれら化合物を用いてレセプターあるいはレセプターのC末端の機能を解析する方法、更にまた、細胞膜レセプターのシグナル伝達を調節する方法、並びに細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法に関する。

(72) [Inventor]

[Name] Upper correct field victory

[Address] Inside of Gumma Prefecture Takasaki City Miyahara town No. 3 Kirin Brewery Co., Ltd. pharmaceutical exploratory research place

(74) [Attorney(s) Representing All Applicants]

[Patent Attorney]

[Name] SATO KAZUO

(57) [Abstract] As for this invention, activity which adjusts function of cytoplasmic membrane receptor where amino acid sequence of the intracellular carboxy end is  $-A_1-A_2-A_3$  it possesses, amino acid sequence of at least 3 in longitudinal direction to possess, Method of analyzing function of C-terminal of receptor or thereceptor novel peptide and biological stability which possess carboxy terminal sequence of  $-X-Y-Z$  (In Formula, as  $X=A_1$  or  $A_1$  amino acid which belongs to the same classification;  $Y=L$ -amino acid or glycine; it belongs to same classification as  $Z=A_3$  or  $A_3$  amino acid), the pharmaceutical composition which contains derivative of said peptide where cytoplasmic membrane permeability or the above-mentioned adjustment activity improves, and salt, and these compound which are admitted in those pharmacological, in addition making use of these compound. Furthermore and, method of adjusting signal transduction of cytoplasmic membrane receptor. And it regards therapeutic method of disease which relates to signal transduction of the cytoplasmic membrane receptor.

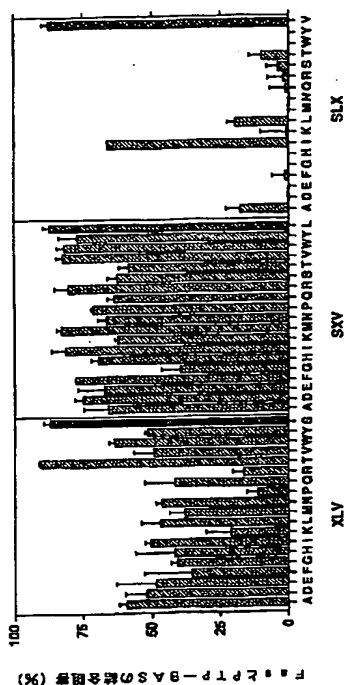
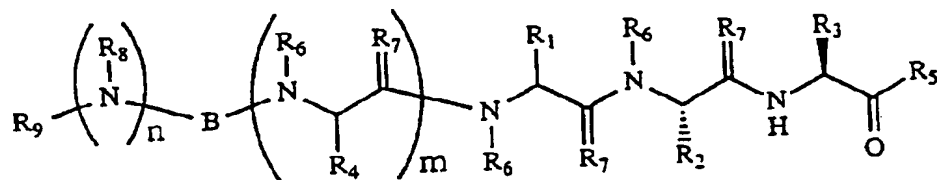


FIG. 3

【特許請求の範囲】 1. 細胞内カルボキシ末端のアミノ酸配列が $-A_1-A_2-A_3$ である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、少なくとも3個のアミノ酸配列を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$ （式中、 $X=A_1$ もしくは $A_1$ と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは $A_3$ と同一分類に属するアミノ酸）のカルボキシ末端配列を有するペプチド、その生物学的安定性、細胞膜透過性、あるいは上記調節活性が向上された該ペプチドの誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 2.  $-X-Y-Z$ の式中、 $A_1$ が $L$ -セリンあるいは $L$ -スレオニンるとき、 $X=\beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸、 $A_1$ が $L$ -セリンあるいは $L$ -スレオニン以外のアミノ酸るとき、 $X=A_1$ ； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは $A_3$ と同一分類に属するアミノ酸のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 3.  $-X-Y-Z$ の式中、 $A_1$ が $L$ -セリンあるいは $L$ -スレオニンであるとき、 $X=\beta$ 位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ もしくは $A_3$ と同一分類に属するアミノ酸のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 4.  $-X-Y-Z$ の式中、 $X=A_1$ もしくは $A_1$ と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$ のカルボキシ末端配列を有する、請求項1のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容

[Claim(s)] It possesses activity which adjusts function of cytoplasmic membrane receptor where the amino acid sequence of 1. intracellular carboxy end is  $-A_1-A_2-A_3$ , peptide and biological stability which possess amino acid sequence of at least 3 in longitudinal direction, possess carboxy terminal sequence of the  $-X-Y-Z$  (In Formula, as  $X=A_1$  or  $A_1$  amino acid which belongs to the same classification;  $Y=L$ -amino acid or glycine; it belongs to same classification as  $Z=A_3$  or  $A_3$  amino acid), derivative of said peptide where cytoplasmic membrane permeability or the above-mentioned adjustment activity improves, and salt which is admitted in those pharmacological. When in Formula of 2.  $-X-Y-Z$ ,  $A_1$  is  $L$ -serine or  $L$ -threonine, when amino acid and  $A_1$  which possess hydroxy group or thiol group in the  $X$ = position are amino acid other than  $L$ -serine or  $L$ -threonine,  $X=A_1$ ;  $Y=L$ -amino acid or glycine; as  $Z=A_3$  or  $A_3$  it possesses the carboxy terminal sequence of amino acid which belongs to same classification, peptide of Claim 1, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. When in Formula of 3.  $-X-Y-Z$ ,  $A_1$  is  $L$ -serine or  $L$ -threonine, the amino acid which possesses hydroxy group or thiol group in  $X$ = position; the  $Y=L$ -amino acid or glycine; as  $Z=A_3$  or  $A_3$  it possesses carboxy terminal sequence of amino acid which belongs to same classification, peptide of the Claim 1, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. In Formula of 4.  $-X-Y-Z$ , as  $X=A_1$  or  $A_1$  amino acid which belongs to same classification;  $Y=L$ -amino acid or

認される塩。 5.  $-X-Y-Z$  の式中、 $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオニン のとき  $\beta$  位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸、 $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオニン 以外のアミノ酸 のとき、 $X=A_1$ ;  $Y=L$ -アミノ酸 あるいはグリシン;  $Z=A_3$  のカルボキシ末端配列を有する、請求項 1 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 6.  $-X-Y-Z$  の式中、 $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオニン であるとき、 $X=\beta$  位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸;  $Y=L$ -アミノ酸 あるいはグリシン;  $Z=A_3$  のカルボキシ末端配列を有する、請求項 1 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 7.  $-X-Y-Z$  の式中、 $X=A_1$ ;  $Y=L$ -アミノ酸 あるいはグリシン;  $Z=A_3$  のカルボキシ末端配列を有する、請求項 1 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 8.  $-X-Y-Z$  の式中、 $X=A_1$ ;  $Y=A_2$ ;  $Z=A_3$  のカルボキシ末端配列を有する、請求項 1 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 9. 細胞内カルボキシ末端のアミノ酸配列が  $-A_1-A_2-A_3$  である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、式 1:



[式中、 $R_1=A_1$  しくは  $A_1$  と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造;  $R_2=L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素;  $R_3=A_3$  しくは  $A_3$  と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造を意味し、 $R_4$  は任意のアミノ酸の側鎖構造であり、 $R_5$  は置換あるいは非置換である  $C_1$  乃至  $C_6$  の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基であるか、または水酸基であり、各  $R_6$  は個々に水素あるいはメチル基であり、各  $R_7$  は個々に水素あるいは酸素であり、 $B$  はカルボニル基あるいは直接結合であり、 $R_8$  および  $R_9$  はそれぞれ水素、あるいは置換もしくは非置換アルキル基、または置換もしくは非置換芳香族基であり、この場合アルキル基は直鎖、分鎖、または環状であり、 $m$  は 0 乃至 12 であり、 $n$  は 0 あるいは 1 であり、さらに  $n$  が 1 の場合は  $R_8$  と  $R_9$  は一緒になって環を形成してもよい; ただし、 $R_6$  および  $R_9$  は同時に水素ではない] で表される、請求項 1 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 10.  $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオ

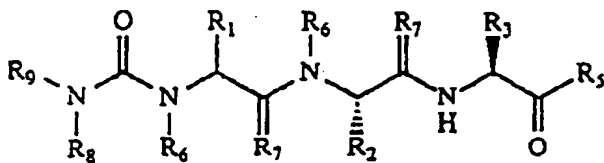
glycine; it possesses carboxy terminal sequence of  $Z=A_3$ , peptide of Claim 1, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. When in Formula of 5.  $-X-Y-Z$ ,  $A_1$  is L-serine or L-threonine, when amino acid,  $A_1$  which possesses hydroxy group or thiol group in  $X=$  position is the amino acid other than L-serine or L-threonine,  $X=A_1$ ;  $Y=L$ -amino acid or the glycine; it possesses carboxy terminal sequence of  $Z=A_3$ , peptide of the Claim 1, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. When in Formula of 6.  $-X-Y-Z$ ,  $A_1$  is L-serine or L-threonine, the amino acid which possesses hydroxy group or thiol group in  $X=$  position; the  $Y=L$ -amino acid or glycine; it possesses carboxy terminal sequence of  $Z=A_3$ , peptide of the Claim 1, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. In Formula of 7.  $-X-Y-Z$ ,  $X=A_1$ ;  $Y=L$ -amino acid or glycine; it possesses carboxy terminal sequence of  $Z=A_3$ , peptide of Claim 1, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. In Formula of 8.  $-X-Y-Z$ ,  $X=A_1$ ;  $Y=A_2$ ; it possesses the carboxy terminal sequence of  $Z=A_3$ , peptide of Claim 1, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. It possesses activity which adjusts function of cytoplasmic membrane receptor where the amino acid sequence of 9. intracellular carboxy end is  $-A_1-A_2-A_3$ , Formula 1:

It is displayed with [In Formula,  $R_1=A_1$  it does and < as  $A_1$  belongs to the same classification side chain structure of amino acid which; side chain structure or hydrogen of  $R_2=L$ -amino acid; As  $R_3=A_3$  or  $A_3$  side chain structure of amino acid which belongs to the same classification is meant, As for  $R_4$  with side chain structure of amino acid of option, As for  $R_5$  is a substituted or unsubstituted straight chain of  $C_1$  to  $C_6$  which, Amount chain, Or it is a alkoxy group of cyclic, Or with hydroxy group, As for each  $R_6$  individually with hydrogen or methyl group, As for each  $R_7$  individually with hydrogen or oxygen, As for  $B$  with carbonyl group or direct bond, As for  $R_8$  and  $R_9$  with respective hydrogen, or substitution or the unsubstituted alkyl group or substitution or unsubstituted aromatic group, in this case as for alkyl group with the straight chain, amount chain, or cyclic, as for  $m$  with the 0 to 12, as for  $n$  when with 0 or 1, furthermore the  $n$  is 1, as for  $R_8$  and  $R_9$  becoming simultaneous, forming ring, good; However,  $R_6$  and

ニンのとき、 $R_1 = \beta$  位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸の側鎖構造、 $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオニン以外のアミノ酸のとき、 $R_1 = A_1$  の側鎖構造； $R_2 = \text{L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素}$ ； $R_3 = A_3$  しくは  $A_3$  と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 11.  $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオニンのとき、 $R_1 = \beta$  位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = \text{L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素}$ ； $R_3 = A_3$  しくは  $A_3$  と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 12.  $R_1 = A_1$  しくは  $A_1$  と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = \text{L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素}$ ； $R_3 = A_3$  しくは  $A_3$  と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 13.  $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオニンのとき、 $R_1 = \beta$  位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸の側鎖構造、 $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオニン以外のアミノ酸のとき、 $R_1 = A_1$  の側鎖構造； $R_2 = \text{L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素}$ ； $R_3 = A_3$  の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 14.  $A_1$  が L-セリンあるいは L-スレオニンのとき、 $R_1 = \beta$  位に水酸基あるいはチオール基を有するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = \text{L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素}$ ； $R_3 = A_3$  の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 15.  $R_1 = A_1$  の側鎖構造； $R_2 = \text{L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素}$ ； $R_3 = A_3$  の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 16.  $R_1 = A_1$  の側鎖構造； $R_2 = A_2$  の側鎖構造； $R_3 = A_3$  の側鎖構造である、請求項 9 のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 17.  $m = 0$  乃至 5 である、請求項 9 乃至 16 のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 18.  $m = 0$  乃至 3 である、請求項 9 乃至 16 のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 19.  $m = 0$  である、請求項 9 乃至 16 のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 20.  $n$  が 0 であり B がカルボニル基であり、かつ  $R_9$  がメチル基であるか；あるいは  $R_5$  が置換または非置換である  $C_1$  乃至  $C_6$  の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基であるか；あるいは、 $n$  が 0 であり B がカルボニル基であり、かつ  $R_9$  がメチル基であり、かつ  $R_5$  が置換あるいは非置換である  $C_1$  乃至  $C_6$  の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基である、請求項 9 乃至 19 のいずれか一項に記載のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 21. B がカルボニル基であり、 $R_9$  が置換もしくは非置換アルキル基、または置換もしくは非置換芳香族基である、請求項 9 乃至 19 のいずれか一項に記載のペプチド誘導体、およびそ

R9 it is a hydrogen simultaneously, ], peptide of Claim 1, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. When 10.  $A_1$  is L-serine or L-threonine, when side chain structure of amino acid which possesses hydroxy group or thiol group in  $R_1 = \beta$  position,  $A_1$  is the amino acid other than L-serine or L-threonine, side chain structure of  $R_1 = A_1$ ; side chain structure or hydrogen of  $R_2 = \text{L-amino acid}$ ;  $R_3 = A_3$  it does and < as the  $A_3$  it is a side chain structure of amino acid which belongs to same classification, peptide of Claim 9, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. When 11.  $A_1$  is L-serine or L-threonine, side chain structure of amino acid which possesses hydroxy group or thiol group in  $R_1 = \beta$  position; side chain structure or hydrogen of  $R_2 = \text{L-amino acid}$ ; as  $R_3 = A_3$  or  $A_3$  it is a side chain structure of amino acid which belongs to same classification, peptide of Claim 9, the salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. As 12.  $R_1 = A_1$  or  $A_1$  side chain structure of amino acid which belongs to the same classification; side chain structure or hydrogen of  $R_2 = \text{L-amino acid}$ ; it is a side chain structure of  $R_3 = A_3$ , peptide of Claim 9, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. When 13.  $A_1$  is L-serine or L-threonine, when side chain structure of amino acid which possesses hydroxy group or thiol group in  $R_1 = \beta$  position,  $A_1$  is the amino acid other than L-serine or L-threonine, side chain structure of  $R_1 = A_1$ ; the side chain structure or hydrogen of  $R_2 = \text{L-amino acid}$ ; it is a side chain structure of  $R_3 = A_3$ , peptide of Claim 9, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. When 14.  $A_1$  is L-serine or L-threonine, side chain structure of amino acid which possesses hydroxy group or thiol group in  $R_1 = \beta$  position; side chain structure or hydrogen of  $R_2 = \text{L-amino acid}$ ; it is a side chain structure of  $R_3 = A_3$ , peptide of Claim 9, the salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. side chain structure of 15.  $R_1 = A_1$ ; side chain structure or hydrogen of  $R_2 = \text{L-amino acid}$ ; it is a side chain structure of  $R_3 = A_3$ , peptide of Claim 9, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. side chain structure of 16.  $R_1 = A_1$ ; side chain structure of  $R_2 = A_2$ ; it is a side chain structure of the  $R_3 = A_3$ , peptide of Claim 9, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. It is a 17.  $m = 0$  to 5, salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claim 9 to 16. It is a 18.  $m = 0$  to 3, salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claim 9 to 16. It is a 19.  $m = 0$ , salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claim 9 to 16. 20.  $n$  being 0, B being carbonyl group, at same time the  $R_9$  is methyl group; Or straight chain of  $C_1$  to  $C_6$  where  $R_5$  is substituted or unsubstituted, it is a amount chain, or a alkoxy group of cyclic; Or,  $n$  being 0, B being carbonyl group, at same time  $R_9$  being methyl group, straight chain of  $C_1$  to  $C_6$

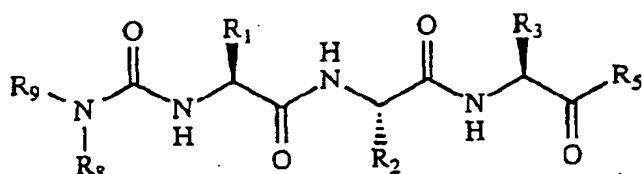
これらの薬学的に容認される塩。 R<sub>5</sub>が置換または非置換であるC<sub>1</sub>乃至C<sub>6</sub>の直鎖、環、または環状のアルコキシ基である、請求項21のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 23. R<sub>7</sub>の少なくとも一つが水素である、請求項9乃至22のいずれか一項に記載のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 24. R<sub>1</sub>あるいはR<sub>4</sub>を側鎖に有する炭素の立体配置の少なくとも一つが、S配置あるいはR配置である、請求項9乃至22のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 25. R<sub>6</sub>の少なくとも一つがメチル基である、請求項9乃至22のいずれか一項に記載のペプチド誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 26. 式2:



[式中、R<sub>1</sub>=L-セリンもしくはL-スレオニンの側鎖構造；R<sub>2</sub>=L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素；R<sub>3</sub>=L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素を意味し、R<sub>5</sub>、R<sub>6</sub>、R<sub>7</sub>、R<sub>8</sub>およびR<sub>9</sub>は前述と同義である；ただし、R<sub>1</sub>がセリンの側鎖であり、かつR<sub>2</sub>がメチオニンの側鎖であり、かつR<sub>3</sub>がグルタミンの側鎖である場合を除く]で表される、請求項9のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。 27. 式3:

where at the same time R<sub>5</sub> is substituted or unsubstituted, it is a amount chain, or a alkoxy group of the cyclic, salt which is admitted in peptide derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claim 9 to 19. 21. B being carbonyl group, R<sub>9</sub> is substitution or unsubstituted alkyl group or substitution or unsubstituted aromatic group, salt which is admitted in peptide derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claim 9 to 19. straight chain of C<sub>1</sub> to C<sub>6</sub> where 22. R<sub>5</sub> is substituted or unsubstituted, it is a amount chain, or a alkoxy group of cyclic, peptide derivative of Claim 21, and salt which is admitted in those pharmacological. at least one of 23. R<sub>7</sub> is hydrogen, salt which is admitted in the peptide derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claim 9 to 22. at least one of steric configuration of carbon which possesses 24. R<sub>1</sub> or the R<sub>4</sub> in side chain, is S arrangement or R arrangement, the salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claim 9 to 22. at least one of 25. R<sub>6</sub> is methyl group, salt which is admitted in the peptide derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claim 9 to 22. 26. Formula 2:

It is displayed with [In Formula, side chain structure of R<sub>1</sub>=L-serine or L-threonine; side chain structure or the hydrogen of R<sub>2</sub>=L-amino acid; side chain structure or hydrogen of R<sub>3</sub>=L-amino acid is meant, the R<sub>5</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub> and R<sub>8</sub> and R<sub>9</sub> earlier description and are synonymous; however, R<sub>1</sub> with side chain of serine, at the same time R<sub>2</sub> with side chain of methionine, when at the same time the R<sub>3</sub> is side chain of glutamine you exclude], peptide of Claim 9, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. 27. Formula 3:



[式中、 $R_1$ =L-セリンもしくはL-スレオニンの側鎖構造； $R_2$ =L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3$ =L-バリン、L-イソロイシンあるいはL-ロイシンの側鎖構造を意味し、 $R_5$ 、 $R_8$ および $R_9$ は前述と同義である]で表される、請求項9のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。28. 細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端がtSXXモチーフである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。29. 細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端がtSXVモチーフである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。30. 細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端がtSXLモチーフである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。31. 細胞膜レセプターがFasである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。32. Fasのカルボキシ末端とPTP-BASとの結合を阻害する活性を有する、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。33. 細胞膜レセプターがVIPレセプターである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。34. 細胞膜レセプターが $\beta_2$ -アドレナジックレセプターである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。35. 細胞膜レセプターがIL-8レセプターである、請求項1乃至27のいずれか一項に記載のペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩。36. 薬学上容認される担体、及び、請求項1乃至35のいずれか一項に記載の化合物の治療有効量を含む医薬組成物。37. 細胞膜レセプターがFasあるいはVIPレセプターであり、抗腫瘍剤である、請求項36の医薬組成物。38. 細胞膜レセプターがIL-8レセプターであり、炎症性疾患の治療剤である、請求項36の医薬組成物。39. 細胞膜レセプターが $\beta_2$ -アドレナジックレセプターであり、循環器系疾患の治療剤である、請求項36の医薬組成物。40. 請求項1乃至27のいずれか一項に記載の化合物を用いて細胞膜レセプターのカルボキシ末端の機能を解析する方法。41. 細胞膜レセプターが発現している細胞あるいは組織に該レセプターのリガ

It is displayed with [In Formula, side chain structure of  $R_1$ =L-serine or L-threonine; side chain structure or the hydrogen of  $R_2$ =L-amino acid;  $R_3$ =L-valine, it means L-isoleucine or L-leucine, the side chain structure  $R_5$  and  $R_8$  and  $R_9$  earlier description and being synonymous, it is], peptide of Claim 9, salt which is admitted in its derivative, and those pharmacological. intracellular carboxy end of 28. cytoplasmic membrane receptor is tSXX motif, salt which is admitted in the peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of the Claims 1 through 27. intracellular carboxy end of 29. cytoplasmic membrane receptor is tSXV motif, salt which is admitted in the peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of the Claims 1 through 27. intracellular carboxy end of 30. cytoplasmic membrane receptor is tSXL motif, salt which is admitted in the peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of the Claims 1 through 27. 31. cytoplasmic membrane receptor is Fas, salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claims 1 through 27. salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which possess activity which obstructs connection with carboxy end and PTP-BAS of 32. Fas, state in any Claim of Claims 1 through 27. 33. cytoplasmic membrane receptor is VIP receptor, salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claims 1 through 27. 34. cytoplasmic membrane receptor is 2-adding  $\beta$ -nadic receptor, salt which is admitted in the peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of the Claims 1 through 27. 35. cytoplasmic membrane receptor is IL-8 receptor, salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which are stated in any Claim of Claims 1 through 27. pharmaceutical composition which includes effective therapeutic amount of compound which is stated in the any Claim of support, and Claims 1 through 35 which on 36. pharmacology are admitted. 37. cytoplasmic membrane receptor with Fas or VIP receptor, is antitumor agent, pharmaceutical composition of the Claim 36. 38. cytoplasmic membrane receptor being IL-8 receptor, it is a therapeutic agent of inflammatory disease, pharmaceutical composition of the Claim 36. 39. cytoplasmic membrane receptor being 2-adding  $\beta$ -nadic receptor, it is a



もしくはそのアゴニストを併用して、請求項40の方法。 42. 細胞膜レセプターからのシグナル伝達にかかわる疾病の哺乳動物に治療有効量の、請求項1乃至35のいずれか一項に記載の化合物を投与することからなる、細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法。 43. 細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病が、腫瘍、炎症性疾患または循環器系疾患である、請求項42の治療方法。

【発明の詳細な説明】  
化合物およびその医薬組成物

新規ペプチド化

技術分野 本発明は細胞膜レセプターの細胞内カルボキシ末端配列をもとにデザインされた、該細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する新規ペプチド化合物に関する。さらに本発明は、該本発明化合物を含有する医薬組成物に関する。

背景技術 細胞膜レセプターは細胞膜上に存在し、リガンドから刺激を受けることによって細胞内にシグナルを伝達する。細胞は細胞膜レセプターからのシグナルにより増殖、増殖停止、分化、細胞死、そして新たな細胞膜レセプターやサイトカインの産生等、多様な変化を引き起こす。それらの細胞レベルでの制御が集約されて個体の恒常性は保たれている一方、細胞膜レセプターからのシグナルの異常は種々の疾病の原因となる。たとえば癌においては癌遺伝子としてクローニングされた遺伝子が細胞膜レセプターをコードしていた例が多数知られているし(erb-B1, neu, fms, flg, kit等)、実際、レセプター型チロシンキナーゼであるEGFレセプターの異常発現が、癌細胞の異常な増殖性の一因となっているケースが報告されている(Shcmike, Cell 37巻, 705-713ページ, 1984年; Zou他, Cancer Res. 47巻, 6123-6125ページ, 1987年)。種々のアレルギー疾患においてはIL-4やIL-5などのサイトカインの産生亢進、すなわち、IL-4レセプター、IL-5レセプターからのシグナルの増強が原因となり得ると考えられている(Meddl eton他(編) Allergy Principles and Practice, 第4版, 第10章, Kay他, 206-211ページ, 1993年)。また、血液疾患、腎疾患、循環器疾患、骨疾患、脳・神経疾患のなかにも細胞膜レセプターからのシグナルの異常に起因するものが存在する。したがって細胞膜レセプターからのシグナルを制御できる薬剤は細胞の反応異常により引き起こされる種

therapeutic agent of cardiovascular disease, the pharmaceutical composition of Claim 40. method which analyzes function of carboxy end of cytoplasmic membrane receptor making use of compound which is stated in any Claim of 40. Claims 1 through 27. ligand or agonist of said receptor are jointly used in cell or tissue which 41. cytoplasmic membrane receptor has revealed, method of Claim 40. therapeutic method of disease which consists of fact that compound which in mammal of disease which relates to signal transduction of 42. cytoplasmic membrane receptor is stated, in any Claim of Claims 1 through 35 of effective therapeutic amount is prescribed, relates to signal transduction of cytoplasmic membrane receptor. disease which relates to signal transduction of 43. cytoplasmic membrane receptor, is tumor, the inflammatory disease or cardiovascular disease, therapeutic method of Claim 42.

[Description of the Invention]

It regards novel peptide compound which possesses activity where novel peptide compound and its pharmaceutical composition technological field this invention design were done on basis of intracellular carboxy terminal sequence of cytoplasmic membrane receptor, adjust function of said cytoplasmic membrane receptor. Furthermore this invention regards pharmaceutical composition which contains said the compound of this invention.

background technology cytoplasmic membrane receptor exists on cytoplasmic membrane, transmits signal to intracellular by the fact that stimulus is received from ligand. cell causes, diverse change such as multiplication and multiplication stop, differentiation, cell death, and new cytoplasmic membrane receptor and production of cytokine with signal from cytoplasmic membrane receptor. Control with those cell level being done, integration as for homeostasis of the solid although it is maintained fault of signal from cytoplasmic membrane receptor becomes cause of various disease. Regarding for example cancer gene which cloning is done cord has been done example which large number has been known cytoplasmic membrane receptor as the cancer gene and (Such as erb-B1, neu, fms, flg, kit), abnormal expression of EGF receptor which really, is a receptor type tyrosine kinase is reported, case which becomes cause of abnormal proliferative of the cancer cell, (Shcmike, Cell (0092-8674) Vol. 37, 705-713 page and 1984; Zou other things, Cancer Res. Vol. 47, 6123-6125 page and 1987). It is thought that production accentuation of IL-4 and IL-5 or other cytokine, reinforcement of signal from namely, IL-4 receptor and IL-5 receptor can become the cause, regarding various allergy (Meddl eton other (編) Allergy principles and Practice, 4th edition and 10th chapter, Kay other things, 206-211 page and 1993). In addition, those which originate in fault of signal from the cytoplasmic membrane receptor even in blood dyscrasia, kidney disease, cardiovascular disease,

々の疾病の治療に応用され得る。遺伝子クローニング技術の進歩により多くの細胞膜レセプターがクローニングされ、その発現が種々の疾患と関係があることを示唆する知見が蓄積されつつある。しかし、癌に関与するレセプター型チロシンキナーゼや、種々の病態に関与すると思われるGプロテインカップルドレセプター(GPCR)の中にはまだリガンドすら知られていないオーファンレセプターが多数存在する。また、リガンドだけでなくほとんどの細胞膜レセプターの細胞内シグナル伝達経路はまだ明らかとなっておらず、細胞膜レセプターの細胞内シグナル伝達をターゲットとした創薬研究は大きなポテンシャルを秘めながらもまだ始まったばかりといえる。現時点までの細胞内シグナル伝達をターゲットとした創薬研究の成果として蛋白質リン酸化酵素の阻害剤、蛋白質のファルネシル化酵素の阻害剤が見出されつつある(Fry他、Science 265巻、1093-1095ページ、1994年; Gibbs他、Cell 77巻、175-178ページ、1994年)。また、最近、蛋白と蛋白の結合に関するドメイン(SH-2ドメイン、ロイジンジッパー等)に注目し、その結合阻害に関する研究も精力的に行われている(Pawson他、Curr. Biol. 3巻、434-442ページ、1993年; Huber他、Curr. Med. Chem. 1巻、13-34ページ、1994年)。レセプターの細胞内領域に蛋白が結合し、レセプターからのシグナル伝達に影響を与えるといった報告は多数あるが、厳密な意味でのレセプターのC末端(ここでは単にC末付近の配列という意味ではなく厳密にレセプターの最末端の配列を含む領域)が他の蛋白との結合に関与している例は殆ど知られていない。Fasにおいては、結合蛋白であるPTP-BASがそのシグナル伝達に与える影響が明らかにされ、C末付近の15アミノ酸領域が細胞死の調節に関わっていることが指摘されているが、厳密にC末端のアミノ酸を含む領域であるかは調べられていない(Sato他、Science 268巻、411-415ページ、1995年)。Kornau等のグループがNMDAレセプターとPSD-95が結合することを見出し、その結合にはNMDAレセプターのC末端の7アミノ酸残基が重要であることを報告した(Kornau他、Science 269巻、1737-1740ページ、1995年)。報文中、数種のNMDAレセプターのC末端に共通している配列をtSXVモチーフと名付け、他の類似の配列を有するレセプターについても公表した。Kim等のグループはShaker型のKチャネルのC末端にもPSD-95が結合することを報告した(Kim他、Nature 378巻、85-88ページ、1995年)。これらの研究はFasとPTP-BASの結合以外にもレセプターのC末端を介した結合が存在することを示している。しかし、これらの研究ではその結合がシグナル伝達に及ぼす影響については何ら示してはいない。また、結合の生理的な役割や結合を阻害したときの細胞レベルあるいは組織レベルでの変化についても何ら示していない。したがって、レセプターの

bone disease and brain nerve disease exist. Therefore as for drug which can control signal from cytoplasmic membrane receptor it can be applied by treatment of various disease which is caused by thereaction fault of cell. Many cytoplasmic membrane receptor cloning are done by progress of gene cloning technology, the knowledge where revelation is a various disease and a relationship and suggests densely is being accumulated. But, a fan receptor which still even ligand is not known large number exists in G protein couple F receptor (GPCR) which is thought that it participates in the receptor type tyrosine kinase and various disease which participate in cancer. In addition, still intracellular signal transduction pathway of most cytoplasmic membrane receptor has not become still clear not only a ligand, although concealing large potential, just started can call creation medicine research which designates intracellular signal transduction of the cytoplasmic membrane receptor as target. inhibitor of protein kinase, inhibitor of farnesyl conversion enzyme of the protein is being discovered as result of creation medicine research which designates intracellular signal transduction to now as target (Fry other things, Science 26 Vol.5, 1093 - 1095 page and 1994; Gibbs other things, Cell (0092-8674) Vol.77, 175 - 178 page and 1994). In addition, recently, you observe to domain (Such as SH-2 domain and leucine zipper) regarding the connection of protein and protein, also research regarding the binding inhibition is done in strenuous, (Pawson other things, Curr. Biol. Vol. 3, 434 - 442 page and 1993; Huber other things, Curr. Med. Chem. Vol.1, 13 - 34 page and 1994). protein connects to intracellular region of receptor, but as for report that there is a large number, it produces effect on signal transduction from receptor, the example where C-terminal (Here is not meaning, arrangement of C terminal vicinity simply and arrangement of terminus of receptor is included strictly region) of receptor in precise sense has participated in connection with other protein is not almost known. Regarding Fas, influence which PTP-BAS which is a connection protein gives to signal transduction to make clear, 15 amino acid region of the C terminal vicinity has related to adjustment of cell death, it is pointed out densely, it is not inspected, that whether it is a region which includes amino acid of C-terminal strictly (Sato other things, Science 26 Vol.8, 411 - 415 page and 1995). Kornau or other group connects NMDA receptor and PSD-95 densely to discover, the 7 amino acid residue of C-terminal of NMDA receptor is important in connection, it reported densely (Kornau other things, Science 2 Vol.69, 1737 - 1740 page and 1995). In report, you named arrangement which is common to C-terminal of NMDA receptor of several kinds tSXV motif, concerning receptor which possesses arrangement of other resemblance you published. PSD-95 reported connects Kim or other group to also C-terminal of K channel of Shaker type densely (Kim other things, Nature 37 Vol.8, 85 - 88 page and 1995). As for these researches is through C-terminal of receptor connection exists densely has shown in addition to

SXVモチーフを介した結合の重要性はまだ十分に知られていない。また、tSXVモチーフ以外にもレセプターC末端の結合に関与するモチーフがあることは現在のところ知られていない。このように、レセプターのC末端がそのレセプターの機能に影響を与えることを示唆する知見は蓄積されつつあるが、まだ、明確にそれは証明されるに至っていない。後述において本発明における例として示したVIPレセプター、 $\beta_2$ -アドレナジックレセプターあるいはIL-8レセプターに関しては、これらのレセプターのC末端がその機能調節に関与していることなどは全く知られていないのが現状である。本発明は、細胞膜レセプターC末端の細胞内シグナル調節に関与する領域(Receptor C-terminal Regulatory Regionの頭文字を取りRCR領域という)の配列をもとにデザインした新規化合物、該化合物を含む医薬組成物及び該化合物を用いてレセプターの機能を解析する方法に関するが、細胞膜レセプターのRCR領域の機能を調節する活性を有する化合物をそのレセプターC末端配列情報に基づきデザインした化合物自体、また、該化合物を用いてレセプターの機能を解析する方法などに関しては本発明者らの知る限りにおいて全く知られていないのが現状である。上記したように本発明はレセプターのC末端の機能を解析する方法にも関するが、当分野の従来の技術は、レセプターのC末端に欠失あるいは置換を導入しその変異レセプターの遺伝子を細胞に導入するという方法が一般的であった。本発明で示したように、レセプターのC末端からデザインした化合物を用い、遺伝子操作技術を用いず、レセプターのC末端の機能を解析する方法は全く知られていない。本発明は、また、細胞膜レセプターC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより細胞膜レセプターのシグナルを調節する方法にも関する。この方法においては阻害剤として本発明の化合物が効果的に用いうる。なお、細胞膜レセプターC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより、細胞膜レセプターのシグナルを調節する方法自体、本発明者らの知る限りにおいて全く知られていないのが現状である。後述において本発明における例として用いた個々のレセプターに関する従来の知見について以下説明する。Fas Fasは細胞表面上に存在するレセプターであり、TNFレセプタースーパーファミリーに属する(Smith他、Cell 76巻、959-962ページ、1994年)。Fasはその細胞外領域にFasリガンドもしくは抗Fas抗体が結合したとき細胞内に細胞死のシグナルを伝え細胞にアポトーシスを誘導する機能をもつことが知られている(Itoh他、Cell 66巻、233-243ページ、1991年; Suda他、Cell 75巻、1169-1178ページ、1993年)。Fasリガンドは細胞障害性T細胞に発現しており、標的細胞を攻撃する際に、Fasを介した系を使用することが知られている(Lowin等、Nature 370巻、650-652ページ、1994年)。Fasを発現する組織は広範に渡りFasを介した細胞死の系が幅広い組織で生理的意義を有すること

connecting Fas and the TNF-BA S. But, what it has not shown in these researches concerning the influence which connection causes to signal transduction. In addition, when obstructing physiological role of connection and connection, with cell level or tissue level what it has not shown concerning change. Therefore, is through tSXV motif of receptor importance of connection has still not been known in fully. In addition, it is not known at present that it is motif which participates in connection of receptor C-terminal in addition to tSXV motif. This way, knowledge where C-terminal of receptor produces effecton function of receptor and suggests densely is being accumulated, but still, that being proven has not reached point of clearly. As for fact that etc C-terminal of these receptor has participated in the functional regulation as example in this invention at time of mentioning later in regard to VIP receptor, 2 - adding  $\beta_2$  adic receptor or IL-8 receptor which it shows, fact that it is not known completely is present state. As for this invention, design it did on basis of arrangement of region (You take head character of Receptor C-terminal Regulatory Region and RCR region call) which participates in intracellular signal adjustment of cytoplasmic membrane receptor C-terminal novel compound, It regards method which analyzes function of receptor making use of pharmaceutical composition and said compound which include said compound but, compound which possesses activity which adjusts function of the RCR region of cytoplasmic membrane receptor on basis of receptor C-terminal sequence information compound itself which design is done, in addition, if these inventors you know in regard to method etc which analyzes function of receptor making use of said compound the fact that it is not known completely in is present state. As inscribed, this invention regards also method which analyzes function of C-terminal of receptor, but method that was general Prior Art of this field introduces deficiency or substitution in C-terminal of receptor and introduces gene of the mutation receptor into cell. As shown with this invention, genetic operation technology is not used making use of compound which design is done from C-terminal of receptor, method which analyzes function of C-terminal of receptor is not completely known. As for this invention, in addition, it regards also method which adjusts the signal of cytoplasmic membrane receptor by obstructing connection with cytoplasmic membrane receptor C-terminal and connection protein. Regarding to this method, compound of this invention can use for effective as inhibitor. Furthermore, if method itself and these inventors which adjust the signal of cytoplasmic membrane receptor by obstructing connection with cytoplasmic membrane receptor C-terminal and the connection protein, you inform fact that it is not known completely in is present state. Below you explain as example in this invention at time of mentioning later concerning conventional knowledge regarding the individual receptor which it uses. Fas Fas with receptor which exists on cell surface, belongs to the TNF receptor superfamily, (Smith

が示唆されている。これまでは Fas に対する抗体等の刺激で癌細胞にアポトーシスを誘導する技術は知られている。インビボにおける Fas を介した細胞死の癌細胞に対する効果としては、B 細胞リンパ腫を移植したヌードマウスに抗 Fas 抗体を投与し、B 細胞リンパ腫を退縮させたことが報告されている (Trauth 他, Science 245 巻, 301-305 ページ, 1989 年)。Fas を有している細胞がかならずしも Fas リガンドや抗 Fas 抗体で細胞死を誘導するわけではなく、Fas を発現しているにもかかわらずアポトーシスが誘導されない癌細胞も多数報告されており、それらの癌細胞に対しては Fas に対する抗体等の刺激は無効である (Wong 他, J. Immunol. 152 巻, 1751-1755 ページ, 1994 年)。Fas の C 末端の 15 アミノ酸残基を欠失した変異型の Fas は正常型 Fas より細胞死を伝える能力が増強されており Fas の C 末端の 15 アミノ酸残基は Fas を介した細胞死の調節領域であることが知られている (Itoh 他, J. Biol. Chem. 268 巻, 10932-10937 ページ, 1993 年)。また、PTP-BAS が細胞内で Fas の C 末端の 15 アミノ酸を含む領域に結合し Fas を介した細胞死シグナルを負に調節することが報告されている (Sato 他, 上述)。PTP-BAS はチロシン脱リン酸化酵素として発見された (Maekawa 他, FEBS Lett. 337 巻, 200-206 ページ, 1994 年)。PTP-BAS は、発見者の違いで hPTP1E, PTPL1 とも呼ばれている (Banville 他, J. Biol. Chem. 269 巻, 22320-22327 ページ, 1994 年; Saras 他, J. Biol. Chem. 269 巻, 24082-24089 ページ, 1994 年)。PTP-BAS の発現はヒト成人の腎臓、肺に最も強く認められ、脳、心臓、脾臓、胎盤等においても発現している。しかし、大腸、末梢血、肝、骨格筋には殆ど発現が認められていない (Maekawa 他, 上述; Banville 他, 上述; Saras 他, 上述)。これら各組織における発現の意義は明らかではない。PTP-BAS を標的とした化合物を用いて癌細胞を殺す方法は、本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。また、Fas と PTP-BAS との相互作用には、Fas の C 末付近の 15 アミノ酸配列が重要との報告がなされているが (Sato 他, 上述; Cleveland 他, Cell 81 巻, 479-482 ページ, 1995 年)、それらの相互作用を阻害する化合物は、本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。VIP レセプター Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) は 28 アミノ酸よりなるニューロペプチドであり、Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Peptide (PACAP)、セクレチン、グルカゴン、カルシトニン、パラサイロイドホルモンらとともにファミリーを形成している。VIP は平滑筋を弛緩させ血流を増加させる機能を有する。また、肺、腸の上皮からの水やイオンの流れ、ニューロンの増殖や生存を調節し、多くの免疫機能にも影響を与える。VIP に選択的な高親和性レセプターは神経系、

other things, Cell (0092-8674) 7 Vol.6, 959-962 page and 1994). Fas when Fas ligand or anti-Fas antibody connect to extracellular region, conveys signal of cell death to intracellular and has function which induces apoptosis in cell, it is known densely, (Itoh other things, Cell (0092-8674) 6 Vol.6, 233-243 page and 1991; Suda other things, Cell (0092-8674) Vol.75, 1169-1178 page and 1993). We reveal Fas ligand in cell damage characteristic T cell, when attack doing target cell, is through Fas system is used has known densely, (Nature 370 volume, 650-652 page and 1994 such as Lowin). tissue which reveals Fas is through Fas overextensively system of cell death being broad tissue, it possesses physiological meaning, it is suggested densely. so far, technology which by antibody or other stimulus for Fas induces apoptosis in cancer cell is known. Anti-Fas antibody was prescribed to nude mouse which B cell lymphoma transplantis done as effect for cancer cell of cell death it is through the Fas in vivo, B cell lymphoma involution was done, it is reported densely, (Trauth other things, Science 2 Vol.45, 301-305 page and 1989). cell which has possessed Fas does by all means and it is not case that it induces cell death with Fas ligand and anti-Fas antibody, has revealed Fas of also cancer cell where apoptosis is not induced in spite large number to be reported, antibody or other stimulus for the Fas vis-a-vis those cancer cell is invalid, (Wong other things, Journal of Immunology (0022-1767, JOIMA3) 1 Vol.52, 1751-1755 page and 1994). As for Fas of mutant type which is deficient capacity which conveys cell death is reinforced 15 amino acid residue of C-terminal of Fas from normal type Fas and Fas it is through 15 amino acid residue of C-terminal of the Fas it is a regulating domain of cell death, it is known densely, (Itoh other things, Journal of Biological Chemistry (0021-9258, JBCHA3) 26 Vol.8, 10932-10937 page and 1993). In addition, PTP-BAS being intracellular, it connects to region which includes 15 amino acid of C-terminal of Fas and it is through the cell death signal it is adjusted is reported Fas to negative number densely (Sato other things, description above). PTP-BAS was discovered (Maekawa other things, FEBS Letters (0014-5793, FEBLAL) 3 Vol.37, 200-206 page and 1994) as tyrosine dephosphorylation enzyme. As for PTP-BAS, also hPTP1E and PTP L1 are called in the difference of heuristic person, (Banville other things, Journal of Biological Chemistry (0021-9258, JBCHA3) 2 Vol.69, 22320-22327 page and 1994; Saras other things, Journal of Biological Chemistry (0021-9258, JBCHA3) 2 Vol.69, 24082-24089 page and 1994). Revelation of PTP-BAS kidney of human adult, is recognized most strongly in lung, regarding brain, heart, pancreas and the placenta etc has revealed. But, revelation is almost not recognized in intestine, peripheral blood, the liver and skeletal muscle, (Maekawa other things, description above; Banville other things, description above; Saras other things, description above). Meaning of revelation in these each tissue is not clear. If these inventors you know method which kills cancer cell making use of the compound which designates

呼吸器系、胃腸系、免疫系のあるサブセットの細胞に発現している。ヒト高親和性タイプⅠプレセプター (HVR1) 遺伝子はひとと大腸癌細胞HT-29からクローニングされ、その染色体遺伝子も取得されている (Couvineau他、Biochem. Biophys. Res. Commun. 193巻、546-553ページ、1993年; Sreedharan他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92巻、2939-2943ページ、1995年)。HVR1はGPCRファミリーに属し、7回膜貫通構造を有する。HVR1の発現はヒトの肺に最も強く認められ、前立腺、末梢血細胞、肝、脳、小腸等においても発現している (Sreedharan他、上述)。VIPのアンタゴニストが非小細胞肺癌の増殖を抑制したこと (Moody他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90巻、4345-4349ページ、1993年)、HVR1遺伝子が小細胞肺癌に関与しているヒト染色体3番の短腕に存在していること (Sreedharan他、上述) からHVR1と肺癌との関係が注目される。VIPレセプターのシグナル伝達機構についてはG蛋白を通してアデニル酸シクラーゼ活性を刺激することが知られている (Couvineau他、J. Biol. Chem. 261巻、14482-14489ページ、1986年; Laburthe他、Ann. N. Y. Acad. Sci. 527巻、296-313ページ、1988年)。しかし、VIPレセプターの細胞内C末端領域がその機能に影響を及ぼすことは、本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。また、VIPレセプターの細胞内シグナル伝達系に選択的に作用する薬剤は本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。 $\beta_2$ -アドレナジックレセプター アドレナジックレセプターは従来、主として薬理学的基準により $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$ 及び $\beta_1$ 、 $\beta_2$ 受容体サブタイプに分類されてきた。 $\beta$ -アドレナジックレセプターはサブタイプにより発現する組織およびその生理的役割が異なり $\beta_1$ は心臓、脂肪組織、大脳皮質に存在し、その活性化は心拍増加、心収縮力増加、脂肪分解を誘導する。 $\beta_2$ は肺、肝臓、小脳、平滑筋、骨格筋、多核白血球に存在し、気管支筋や脈管平滑筋の弛緩を引き起こす。それぞれのレセプターの生理的機能が異なるのでそれぞれに特異的な阻害剤が求められているが、既存の $\beta$ -アドレナジックレセプター阻害剤は選択性が低い。特に $\beta_2$ -アドレナジックレセプターに対する特異的阻害剤はほとんどなく、ある程度選択的な阻害剤としてブトキサミンが知られているのみである。特異的 $\beta_2$ -アドレナジックレセプター阻害剤は $\beta_2$ -アドレナジックレセプターの異常亢進が見られる緑内障患者の治療に利用できる。既存の $\beta_2$ -アドレナジックレセプター阻害剤は選択性が低いため、心臓等 $\beta_1$ -アドレナジックレセプターが多量に発現している組織への副作用が問題となっている。したがってもうひとつの特異的 $\beta_2$ -アドレナジックレセプター阻害剤の有用性として、非選択的 $\beta$ -アドレナジックレセプター阻害剤の副作用の軽減に利用できる可能性が考えられる。 $\beta_2$ -アドレナ

P TP - BAS as target, it is not known so far in. In addition, 15 amino acid sequence of C-terminal vicinity of Fas has done report that importance to interaction of Fas and P TP - BAS, but if (Sato other things, description above; Cleveland other things, Cell (0092-8674) Vol.81, 479-482 page and 1995), these inventors you know compound which obstructs those interaction, it is not known so far in. VIP receptor Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) with neuropeptide which consists of 28 amino acid, Pituitary Adenylate Cyclase - Activating Peptide (PACAP) and the calcitonin, forms glucagon, calcitonin, parathyroid hormone and others and also family. VIP smooth muscle relaxing, blood flow has function which increases. In addition, water from epithelium of lung and intestine and flow of ion, multiplication and survival of neuron are adjusted, effect is produced to also many immune function. In VIP nervous system, respiratory system and gastrointestinal system, it reveals these selective high affinity receptor in cell of subset which has immune system human high affinity type 1 VIP receptor (HVR1) gene cloning is done from one carcinoma of the colon cell HT - 29, also chromosome gene is acquired, (Couvineau other things, Biochemical and Biophysical Research Communications (0006-291X, BBRCA) 19 Vol. 3, 546-553 page and 1993; Sreedharan other things, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027-8424) Vol.92, 2939-2943 page and 1995). HVR1 belongs to GPCR family, possesses 7 time membrane penetration structure. Revelation of HVR1 is recognized most strongly in lung of the human, regarding prostate, peripheral blood cell, liver, brain and the small intestine etc has revealed, (Sreedharan other things, description above). antagonist of VIP controlling multiplication of non-small cell lung carcinoma (Moody other things, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (0027-8424) 90 volume, 4345-4349 page and 1993), relationship between HVR1 and lung cancer is observed from the thing (Sreedharan other things, description above) which exists in short arm of human chromosome third where HVR1 gene has participated in small cell lung carcinoma. Concerning signal transduction mechanism of VIP receptor adenylate cyclase activity is stimulated is known densely through G protein, (Couvineau other things, Journal of Biological Chemistry (0021-9258, JBCHA3) 261 Vol. 61, 14482-14489 page and 1986; Laburthe other things, Ann. N. Y. Acad. Sci. 527 Vol. 27, 296-313 page and 1988). But, if these inventors you know that intracellular C-terminal region of VIP receptor exerts influence on function, it is not known so far in. In addition, if selectively these inventors you know drug which operates in intracellular signal transduction system of VIP receptor, it is not known so far in. 2- adding  $\beta$  adrenergic receptor adding  $\beta$  adrenergic receptor until recently, was classified to the 1, 2 and 1 and 2 receptor subtype by pharmacological reference mainly. As for - adding  $\beta$  adrenergic receptor tissue and its physiological role which are revealed

ジックレセプターは1987年にクローニングされたGPCRファミリーに属するレセプターである(Kobilka他, J. Biol. Chem. 262巻、7321-7327ページ、1987年)。 $\beta_2$ -アドレナジックレセプターはG蛋白質を介してアデニル酸シクラーゼを活性化することが知られている。 $\beta_2$ -アドレナジックレセプターの細胞内C末端域付近は同種脱感作に関係があることが報告されている。 $\beta_2$ -アドレナジックレセプターの細胞内シグナル伝達系に選択的に作用する薬剤は本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。

IL-8レセプター インターロイキン-8(IL-8)は分子量8kDaの72アミノ酸からなるペプチドであり、インターロイキン-1及び他の刺激性サイトカインによる活性化に伴い多様な細胞型により産生される(Westwick他, Immunology Today 10巻、146ページ、1988年)。IL-8は、好中球の走化性及び脱顆粒を促進する。IL-8はインビトロでは好中球の潜在的な化学誘因剤であり、インビボでは強力な炎症効果を有することが示されている。さらに、種々の炎症性疾患患者の患部や血液中にはIL-8の産生が見られ、慢性関節リウマチ、痛風、好中球性皮膚炎、喘息、潰瘍性大腸炎、敗血症、成人呼吸切迫症候群、白血病などの疾患にはIL-8が関与していることが明らかにされている。このため、IL-8作用の阻害剤またはアンタゴニストが有用な抗炎症剤であることが期待される。IL-8のレセプターはGPCRファミリーに属する分子量約60kDaの糖蛋白であり、1991年にクローニングされた(Holmes他, Science 253巻、1278-1280ページ、1991年; Murphy他, Science 253巻、1280-1283ページ、1991年)。IL-8レセプターはタイプAとタイプBが知られており、タイプAとタイプBで発現する細胞が異なる。タイプAはPHA刺激T細胞、CD4<sup>+</sup>T細胞、単球、滑膜細胞、好中球など広い範囲に発現している。一方、タイプBは主に好中球に発現が見られる。疾病との関わりとして、白血球浸潤を伴う好中球性皮膚炎においては、IL-8レセプターの発現が著しく増加すること(Kemeny他, Int. Arch. Allergy Immunol. 104巻、317-322ページ、1994年)、急性糸球体腎炎モデルで抗IL-8抗体の投与によりたんぱく尿を抑制し得ること等が報告されている(Wada他, J. Exp. Med. 180巻、1135-1140ページ、1994年)。IL-8レセプターの細胞内領域にはG蛋白が結合しており、シグナル伝達に関与することが報告されている(Kupper他, Biochem. J. 282巻、429-434ページ、1992年)。しかし、IL-8レセプターの細胞内C末端領域がその機能に影響を及ぼすことは、本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。また、IL-8レセプターの細胞内シグナル伝達系に選択的に作用する薬剤は本発明者らの知る限りにおいてこれまで知られていない。本発明は、細胞膜レセプターの細胞内カル

with subtype differ and exists in heart, the fat tissue and cerebral cortex, activation induces heart beat increase, cardiac contractility increase and lipid fraction solution. 2 exists in lung, liver, cerebellum, smooth muscle, the skeletal muscle and polynuclear leukocyte causes relaxation of bronchial muscle and vein smooth muscle. Because physiological function of respective receptor differs, specific inhibitor is sought respectively, but existing  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor inhibitor selectivity is low. Especially there is not a specific inhibitor for  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor for the most part, buto キサミン only is known is as certain extent selective inhibitor. As for specific  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor inhibitor it can utilize in treatment of the glaucoma patient where you can see fault accentuation of  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor. As for existing  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor inhibitor because selectivity is low, side effect to the tissue which

1 - adding  $\beta_2$  nadic receptor has revealed in large amounts such as heart has become problem. Therefore as usefulness of another specific  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor inhibitor, you can think the possibility which can be utilized in reduction of side effect of unselective  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor inhibitor. 2 - adding  $\beta_2$  nadic receptor is receptor which belongs to GPCR family which cloning is done in 1987, (Kobilka other things, Journal of Biological Chemistry (0021-9258, JBCHA3). Vol. 262, 7321 - 7327 page and 1987). As for  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor through G protein, adenylate cyclase is known is activated densely. intracellular C terminal region vicinity of  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor is a relationship in homologous desensitization, it is reported densely. If selectively these inventors you know drug which operates in intracellular signal transduction system of  $\beta_2$ -adding  $\beta_2$  nadic receptor, it is not known so far in. IL-8 receptor interleukin-8(IL-8) with peptide which consists of 72 amino acid of molecular weight 8 kDa, is produced with interleukin-1 and other irritability cytokine by diverse cell type attendant upon activation (Westwick other things, Immunology Today Vol. 10, 146 page and 1988). IL-8 promotes chemotaxis and degranulation of neutrophil. IL-8 with in-vitro with potential chemistry cause agent of neutrophil, with in vivo has strong inflammation effect, it is shown densely. Furthermore, you can see production of IL-8 in afflicted part of the various inflammatory disease patient and in blood, chronic rheumatoid arthritis, gout and neutrophil characteristic dermatitis, asthma, ulcerative colitis, septicemia and adult breath impedance syndrome, IL-8 has participated in leukemia or other disease, it is made densely clear. Because of this, inhibitor or antagonist of IL-8 action is useful anti-inflammatory, it is expected densely. receptor of IL-8 with sugar protein of molecular weight approximately 60 kDa which belongs to GPCR family, cloning was done in 1991, (Holmes other things, Science 25 Vol. 3, 1278 - 1280 page and 1991; Murphy other things, Science 25 Vol. 3, 1280 - 1283 page and 1991). As for IL-8 receptor type A and type

ボキシ末端配列をもとにデザインした、該細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する新規化合物を開発することを目的とする。また、本発明は、該新規化合物を含む新規医薬組成物を開発することを目的とする。さらに、本発明は、該新規化合物を用いて細胞膜レセプターのC末端の機能を解析する方法を提供することを目的とする。更にまた、本発明は、細胞膜レセプターのシグナル伝達を調節する方法を提供すること、並びに細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法を提供することを目的とする。

発明の開示 本発明者らは、上記の目的に即して鋭意研究を行った結果、まず、FasのC末端配列を有するペプチド及びそれらの誘導体がFasとPTP-BASとの結合を阻害する活性を有することを初めて見出すと共に、それらの化合物が細胞死シグナルを正に調節することを見出した。すなわち、FasとPTP-BASとの結合を阻害するのに必要なペプチドの単位を求め、その誘導体を癌細胞に作用させたところこのものがFasによる細胞死シグナルを増強することを見出した。次いで、本発明者らは、Fasとは全く異なるレセプターファミリーに属するVIPレセプターに関して、このレセプターのC末端配列を有するペプチド誘導体がVIPレセプターの機能を抑制することを見出した。すなわち、該ペプチド誘導体が、マグヌスの系でVIP依存的な気管支の弛緩を抑制することを見出した。さらに、本発明者らはFas、VIPレセプターとはC末端配列の異なる $\beta_2$ -アドレナジックレセプターやIL-8レセプターに関してもそれらのC末端配列をもとにデザインされたペプチド誘導体がそれらレセプターの機能に何らかの効果を示すことを見出した。すなわち、 $\beta_2$ -アドレナジックレセプターのC末端配列をもつペプチド誘導体が、 $\beta_2$ -アドレナジックレセプターにアゴニスティックに作用するイソプロテレノールにより誘導される気管支の弛緩を抑制すること、さらにIL-8レセプターのC末端配列をもつペプチド誘導体がIL-8により誘導されるカルシウムの細胞内取り込みを選択的に抑制することを見出した。これらのことは、レセプターの属するファミリー、あるいは該レセプターのC末端のアミノ酸残基の種類によらず、広くレセプターのC末端領域がそのシグナル伝達に何らかの関与をしており、しかもレセプターのC末端に関するアミノ酸配列の情報が得られるならば、それらに基づいてデザインされたペプチドあるいはその誘導体は、そのレセプターのリガンドや、細胞内シグナル伝達経路の詳細がたとえわからなくても該レセプターのシグナル伝達を制御し得ることを意味しているといえる。上記した4つのレセプターはC末端から3番目のアミノ酸残基がセリンまたはスレオニンであるという共通した特徴を有している。本発明者らは、さらに、該特徴を有しているレセプター群に関してGCGソフトウェアパッケージ（ジェネティックスコンピューターグループ社製）を使用して、PIP-Proteinデータベースを検索し、そのC末端配列の特徴に基づいて分類し、下表の結果を得た。その特徴を有するレセプタ

B are known, cell which revealed with type A and type B differs. type A PHA stimulus T cell, has revealed in wide range such as CD4+ T cell, monocyte, synovial membrane cell and neutrophil. On one hand, type B revelation is seen mainly in neutrophil. Revelation of IL-8 receptor increasing considerably as relation with the disease, regarding neutrophil characteristic dermatitis which accompanies the leukocyte invasion, (Kemeny other things, Int. Arch. Allergy Immunol. Vol.104, 317-322 page and 1994), etc, it is reported with acute glomerular nephritis model that it can control the protein urine with dosage of anti-IL-8 antibody (Wada other things, Journal of Experimental Medicine (0022-1007, JEMEA) 1 Vol. 80, 1135-1140 page and 1994). G protein has connected to intracellular region of IL-8 receptor, participates in the signal transduction is reported densely (Kupper other things, Biochemical Journal (0264-6021, BIJOAK) 2 Vol.82, 429-434 page and 1992). But, if these inventors you know that intracellular C-terminal region of IL-8 receptor exerts influence on function, it is not known so far in. In addition, if selectively these inventors you know drug which operates in intracellular signal transduction system of IL-8 receptor, it is not known so far in. novel compound which possesses activity where this invention design was done on basis of intracellular carboxy terminal sequence of cytoplasmic membrane receptor, adjusts function of the said cytoplasmic membrane receptor is developed densely makes objective. In addition, this invention develops novel pharmaceutical composition which includes said novel compound densely makes objective. Furthermore, this invention offers method which analyzes function of the C-terminal of cytoplasmic membrane receptor making use of said novel compound densely makes the objective. furthermore and, this invention offers method which adjusts the signal transduction of cytoplasmic membrane receptor, and therapeutic method of disease which relates to the signal transduction of cytoplasmic membrane receptor is offered densely makes objective. As for Disclosure of Invention these inventors, conforming to above-mentioned objective, as for the result of doing diligent research, first, it possesses activity where the peptide and those derivative which possess C-terminal arrangement of Fas obstruct connection with Fas and PTP-BAS, as you discover densely for first time, those compound cell death signal adjust discovered densely just. unit of necessary peptide was sought in order to obstruct the connection with namely, Fas and PTP-BAS, its derivative when it operated the cancer cell this reinforces cell death signal discovered densely with Fas. Next, as for these inventors, peptide derivative which possesses C-terminal arrangement of this receptor Fas in regard to VIP receptor which belongs to receptor family which differs completely, controls function of VIP receptor discovered densely. namely, said peptide derivative, controls relaxation of VIP dependent bronchium discovered densely with system of magnetic jp10 ス. Furthermore, as for these inventors Fas and

一を本発明において t S X X モチ を有するレセプターと称す。ここで S はセリン又はスレオニンを示し、各 X は任意のアミノ酸を示す。

VIP receptor in regard to the 2 - adding L nadic receptor and IL - 8 receptor where C-terminal arrangement differs on the basis of those C-terminal arrangements peptide derivative which design is done shows a some effect in function of those receptor, you discovered densely. Even C-terminal arrangement of namely, 2 - adding L nadic receptor peptide derivative, controls relaxation of bronchium which is induced by isoproterenol which operates cog varnish T. つく in 2 - adding L nadic receptor, furthermore peptide derivative which has C-terminal arrangement of IL - 8 receptor the intracellular taking in of calcium which is induced by IL - 8 selectively is controlled discovered densely. These it must be, receptor it belongs family, Or in types of amino acid residue of C-terminal of said receptor it to depend, If C-terminal region of receptor has done a some participation widely in the signal transduction and furthermore information of amino acid sequence regarding C-terminal of the receptor is acquired, as for peptide or its derivative which design is done, the ligand of receptor and, details of intracellular signal transduction pathway not understanding even if on basis of those, it can control signal transduction of said receptor, you can say that it is semantic densely. It has possessed feature where as for receptor of the 4 which was inscribed that amino acid residue of 3rd is serine or the threonine from C-terminal, you say and is in common. these inventors using GCG software package ( di えね T. つくす computer group supplied ) furthermore, in regard to receptor group which has possessed said feature, searched PIP - protein database, classified on the basis of feature of C-terminal arrangement, acquired result of subsurface. Regarding to this invention, it names receptor which possesses feature the receptor which possesses tSXX motif. S shows serine or threonine here, each X shows the amino acid of option.



## 番号 - t S X Xモチーフを有するヒトレセプター

A27079 - fibronectin receptor alpha chain  
 A54260 - glutamate receptor 6 kainate-preferring receptor  
 A55493 - oxytocin receptor  
 JC1350 - transforming growth factor beta receptor III  
 OYHUCR - natriuretic peptide receptor C  
 S34486 - calcitonin receptor  
 S51316 - prostaglandin E receptor, subtype EP3C  
 A25690 - insulin-like growth factor I receptor  
 A36243 - luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor 1  
 A45363 - growth hormone-releasing hormone receptor  
 S37182 - ALK-2 protein  
 JP0077 - protein-tyrosine kinase sky  
 A53587 - prostanoid IP receptor  
 S36750 - cannabinoid receptor CB2  
 A23261 - nicotinic acetylcholine receptor gamma chain  
 A48754 - CTLA-4 counter-receptor B7-2  
 A49690 - prostaglandin E receptor, subtype EP1  
 JN0605 - somatostatin receptor 4  
 OYHUHX - heat-stable enterotoxin receptor  
 S21052 - interleukin-5 receptor  
 S26667 - G protein-coupled receptor BLR  
 OYHUAR - natriuretic peptide receptor A  
 A40144 - prolactin receptor long form  
 A48833 - zona pellucida secondary sperm receptor ZP2  
 S12050 - protein-tyrosine-phosphatase beta  
 A31460 - leukocyte surface glycoprotein CD16  
 A36563 - mannose receptor  
 C55733 - G protein-coupled receptor GPR3  
 JC2331 - adrenergic receptor alpha 1A  
 JC2463 - vasoactive intestinal peptide receptor

## C末端配列

KPPAT SDA  
 LPGKE TMA  
 SCSQP STA  
 PCSSS STA  
 IRSHF SYA  
 IIEQE SSA  
 NEIIQ TEA  
 PLPQS STC  
 DKTRY TEC  
 AKVLT SMC  
 LDKLK TDC  
 GLLPH SSC  
 ASVAC SLC  
 RDLDL SDC  
 RPYLP SPD  
 CDKSD TCF  
 RHSGI SHF  
 PLTRT TTF  
 TDKES TYF  
 ETLED SYF  
 NATSL TTF  
 ERGSS TRC  
 ACFTH SFH  
 EKRTV SNH  
 RDPVY SRH  
 YFSVK TNI  
 EQNEH SVI  
 PATYN SMI  
 SNLRE TOI  
 LQTET SVI

RWHUT4 - T-cell surface glycoprotein CD4  
 S54875 - antigen CD97  
 A42086 - nerve growth factor receptor homolog  
 A42100 - TGF-beta type II receptor  
 A48933 - gamma-aminobutyric acid receptor alpha5 subunit  
 JC2016 - cell adhesion receptor CD36  
 RWHUIC - cell surface glycoprotein CD11c  
 S10505 - nicotinic acetylcholine receptor beta-2 chain  
 A53611 - interleukin-8 receptor B  
 PFHUGB - platelet-derived growth factor receptor beta  
 A41795 - somatostatin receptor 1  
 S32501 - somatostatin receptor SSTR3  
 JH0329 - G-CSF receptor D7  
 S25852 - glutamate receptor GluR1  
 JC2131 - metabotropic glutamate receptor 5 B  
 JC2132 - metabotropic glutamate receptor 5 A  
 QRHUB2 - beta-2-adrenergic receptor  
 A33786 - thyrotropin receptor  
 JQ1486 - activin receptor II  
 S00478 - surface glycoprotein CDw32  
 B53506 - folate receptor type gamma'  
 A49191 - parathyroid hormone related peptide receptor  
 A45481 - endothelin receptor A subtype  
 JL0118 - IgG Fc receptor IIa  
 RWHUC2 - T-cell surface glycoprotein CD2  
 A30586 - B-cell surface antigen CD20  
 A41266 - fibroblast growth factor receptor 1  
 JQ1618 - thyrotropin receptor vl. 3  
 A55733 - G protein-coupled receptor GPR1  
 A56395 - secretory phospholipase A2 receptor  
 JQ1488 - bradykinin B2 receptor  
 JH0449 - histamine H2 receptor  
 S10127 - muscarinic acetylcholine receptor M3  
 A35300 - G protein-coupled receptor edg-1

FQKTC SPI  
 LRASE SGI  
 LPTAA SGK  
 DGS LN TTK  
 IKGAA SPK  
 ACRSK TIX  
 TPSPP SEK  
 OHSAP SSK  
 SGHTS TTL  
 AEAED SFL  
 CTSRI TTL  
 STMRI SYL  
 LFPIT SVL  
 MPLGA TGL  
 YTQSS SSL  
 YTQSS SSL  
 CSTND SLL  
 EBYMQ TYL  
 FPPKE SSL  
 RKKRI SGL  
 HFIQD SCL  
 QEEWE TYM  
 SSHKD SMN  
 NDHVN SNH  
 NSLSP SSH  
 PIEND SSP  
 AWLTV TRP  
 KAPSS STP  
 LCLLE TAQ  
 SDLEX SDQ  
 QDWAG SRQ  
 APQGA TDR  
 YRNIG TAR  
 SGNVH SSS

A35648 - B-cell receptor CD22  
 JN0708 - thyrotropin-releasing hormone receptor  
 JN0807 - glucagon-like peptide-1 receptor  
 JQ1042 - endothelin receptor B  
 S24356 - antidiuretic hormone receptor  
 A38142 - APO-I antigen, Fas antigen  
 A47253 - epidermal growth factor receptor, HER4  
 GQHUN - nerve growth factor receptor, low affinity  
 TYHUAS - transforming protein mas  
 JN0604 - VIP receptor  
 A46151 - protein-tyrosine-phosphatase zeta  
 S12051 - protein-tyrosine-phosphatase gamma  
 A43956 - serotonin receptor 5HT-2  
 JS0616 - serotonin receptor 5HT-1C  
 S48736 - serotonin 5-HT2B receptor protein  
 A47551 - NMDA receptor chain 1  
 S47555 - NMDA receptor modulatory chain hNR2A  
 A55689 - G-protein-coupled receptor 3  
 S39534 - corticotropin-releasing hormone receptor  
 QRHUB1 - beta-1-adrenergic receptor  
 S39495 - u-plasminogen activator receptor form 2  
 A37223 - alpha-2B-adrenergic receptor  
 A47111 - melanocortin receptor 4  
 S29506 - neurotensin receptor

MRCPI	TQS
SEVSF	SQS
ATCQA	SCS
SSXY	SSS
SLAKD	TSS
RNEIQ	SLV
YRHRN	TVV
ESTAT	SPV
TVTVE	TVV
FQAEV	SLV
AESLE	SLV
AESME	SLV
VNEKV	SCV
YSERI	SSV
TEEQV	STV
DPSVS	TVV
FQAEV	SLV
RSRSP	SDV
SIKQS	TAV
GFASE	SKV
EEAQA	THV
RPWTQ	TAV
LCOLS	SRY
NATRE	TLV

上記表中には含まれていないが、IgE FcεRI-γのようにC末が翻訳後修飾により変化し、tSXXモチーフを持つようになるものも存在する。細胞膜レセプターのRCR領域において、C末端より3番目のアミノ酸がセリンあるいはスレオニンである一連の配列を、本発明において上記のようにtSXXモチーフと称すが、それらの中で、例えばC末端のアミノ酸がバリンであるものについてはtSXVモチーフ、またロイシンであるものについてはtSXLモチーフと称す。以下、C末端のアミノ酸により同様に呼称する。以上、これら複数の新規知見を基に本発明者らは本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、細胞内カルボキシル末端のアミノ酸配列が-A<sub>1</sub>-A<sub>2</sub>-A<sub>3</sub>である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、少なくとも3個のアミノ酸配列を長さ方向に有し、-X-Y-Z(式中、X=A<sub>1</sub>もしくはA<sub>1</sub>と同一分類に属するアミノ酸；Y=L-アミノ酸あるいはグリシン；Z=A<sub>3</sub>もしくはA<sub>3</sub>と同一分類に属するアミノ酸)のカルボキシル末端配列を有するペプチド、その生物学的安定性、細胞膜透過性、あるいは上記調節活性が向上された該ペプチドの誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩を提供するものである。また、本発明はこれらの化合物を含有する医薬

It is not included in above-mentioned in the table. Like IgE Fc RI - C terminal it changes with posttranscription decoration, also those which reaches point where it has tSXX motif exist. In RCR region of cytoplasmic membrane receptor, regarding to this invention, as description above it names consecutive arrangement to which amino acid of the 3rd is serine or threonine, tSXX motif from C-terminal, but it names tSXL motif tSXV motif, concerning those which in addition are alanine among those, concerning those where amino acid of for example C-terminal is the valine. You name in same way below, with amino acid of C-terminal. Above, these inventors this invention reached to completion on the basis of novel knowledge of these plural. namely, this invention has activity which adjusts function of cytoplasmic membrane receptor where the amino acid sequence of intracellular carboxyl terminal is - A1 - A2 - A3, peptide and biological stability which possess amino acid sequence of at least 3 in longitudinal direction, possess carboxy terminal sequence of the - X - Y - Z (In Formula, as X= A1 or A1 amino acid which belongs to the same classification; Y=L - amino acid or glycine; it belongs to same classification as Z= A3 or A3 amino acid), it is something which offers derivative of said

組成物を提供するものである。また、本発明はこれら化合物を用いて細胞膜レセプターのC末端の機能を解析する方法を提供するものである。また更に、本発明は細胞膜レセプターC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより細胞膜レセプターのシグナルを調節する方法、及び、細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法をも提供するものである。本発明の化合物はそれぞれの対応する細胞膜レセプターとは全く異なる分子であり、対応するレセプターのC末端と競合することにより該レセプターからのシグナルを調節する活性を有する化合物である。ここにおいて、「レセプターからのシグナルを調節する活性を有する」とは「レセプターからのシグナルを阻害もしくは増強する活性を有する」ということを意味する。またここでいう「阻害」とはいかなる程度での阻害をも意味し、必ずしも完全なる阻害に限定されるものではない。

図面の簡単な説明 図1は、FasのC末端15アミノ酸ペプチドによるインビトロのFas/PTP-BAS結合阻害を示すオートラジオグラムである。図2は、インビトロのFas/PTP-BASの結合におよぼす長さの異なるFasのC末端ペプチドの影響を示すグラフである。図3は、Ac-SLVの各アミノ酸を他のL-アミノ酸あるいはグリシンに置き換え、スキャンしたペプチド1mM存在下におけるインビトロのFas/PTP-BAS結合阻害を示すグラフである。図4は、Ac-SLVのLを他のL-アミノ酸あるいはグリシンに置き換え、スキャンしたペプチド0.1mMの存在下におけるインビトロのFas/PTP-BAS結合阻害を示すグラフである。図5は、Ac-SLVとAc-TLVのインビトロFas/PTP-BAS結合阻害の濃度依存性曲線を示すグラフである。

図6は、D体、Nメチル体、還元体ペプチドのインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を示すグラフである。図7は、N末端修飾体のインビトロFas/PTP-BAS結合阻害の濃度依存性曲線を示すグラフである。図8は、C末端修飾体のインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を示すグラフである。図9は、マイクロインジェクションによりヒト大腸癌DLD-1細胞内に注入されたAc-SLVの細胞死誘導作用を示す生物の形態の写真である。矢印は典型的なアポトーシス像を示す。図10は、Cyh-NHCO-SLV-OMe、Cyh-NHCO-SLV-OEt、Ph-NHCO-SLV-OMe、Ph-NHCO-SLV-OEtのヒト大腸癌細胞DLD-1に対する細胞死誘導作用を示すグラフである。図11は、Ph-NHCO-SLV-OEtのヒト大腸癌細胞DLD-1に対する細胞死誘導作用を示す生物の形態の写真である。図12は、VIP依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLV-OEtの作用を示すグラフである。図13は、VIP依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLA-OEtの作用を示すグラフである。図14は、VIP依存的気管支の弛緩に対するPh-NHCO-SLL-OEtの作用を示すグラフである。

peptide where the cytoplasmic membrane permeability or above-mentioned adjusting activity improves, and the salt which is admitted in those pharmacological. and this invention are something which offers pharmaceutical composition which contains these compound. furthermore and, this invention is something which offers the method which analyzes function of C-terminal of cytoplasmic membrane receptor making use of these compound. and furthermore, as for this invention method of adjusting the signal of cytoplasmic membrane receptor by obstructing connection with cytoplasmic membrane receptor C-terminal and connection protein. It is something which offers also therapeutic method of disease which relates to signal transduction of and cytoplasmic membrane receptor. As for compound of this invention cytoplasmic membrane receptor to which each one corresponds with molecule which differs completely, is compound which possesses the activity which adjusts signal from said receptor by competing with the C-terminal of receptor which corresponds. At this point, "activity which adjusts signal from receptor it possesses" with "activity which it obstructs or reinforces signal from receptor and it possesses" with you say, it means densely. In addition you say here, it is not something which "Obstruction" with means the obstruction with every extent, complete is always limited in obstruction. simple explanation Figure 1 of drawing is autoradiogram which shows Fas/PTP-BAS binding inhibition of in-vitro with C-terminal 15 amino acid peptide of Fas. Figure 2 is graph which shows influence of C-terminal peptide of the Fas where length which is caused to connection of Fas/PTP-BAS of in-vitro differs. It is a graph which shows Fas/PTP-BAS binding inhibition of in-vitro in under peptide 1 mM existing which each amino acid of Ac-SLV replaces Figure 3, to the other L-amino acid or glycine, scan it does. It is a graph which shows Fas/PTP-BAS binding inhibition of in-vitro in under existing of the peptide 0.1 mM which L of Ac-SLV replaces Figure 4, to the other L-amino acid or glycine, scan it does. Figure 5 is graph which shows concentration dependency curve of in-vitro Fas/PTP-BAS binding inhibition of Ac-SLV and Ac-TLV. Figure 6 is graph which shows in-vitro Fas/PTP-BAS binding inhibition of D isomer, N methyl compound and reduction product peptide. Figure 7 is graph which shows concentration dependency curve of in-vitro Fas/PTP-BAS binding inhibition of N terminal decoration body. Figure 8 is graph which shows in-vitro Fas/PTP-BAS binding inhibition of C-terminal decoration body. Figure 9 is photograph of form of organism which shows cell death induction of Ac-SLV which was filled in human carcinoma of the colon DLD-1 intracellularly by microinjection. arrow shows typical apoptosis image. Figure 10 is graph which shows cell death induction for human carcinoma of the colon cell DLD-1 of the Cyh-NHCO-SLV-OMe, Cyh-NHCO-SLV-OEt, Ph-NHCO-SLV-OMe and Ph-NHCO-SLV-OEt. Figure 11 is photograph of form of organism which shows cell

図 15 は、VIP 依存的気管支の弛緩に対する Ph-NHCO-SLV-OH の作用を示すグラフである。図 16 は、ISO 依存的気管支の弛緩に対する Ph-NHCO-SLL-OEt の作用を示すグラフである。図 17 は、ISO 依存的気管支の弛緩に対する Ph-NHCO-SLA-OEt の作用を示すグラフである。図 18 は、ISO 依存的気管支の弛緩に対する Ph-NHCO-SLV-OEt の作用を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態 I.  
 本発明の化合物 本発明の化合物は、C 末端領域にシグナル調節領域 (RCR 領域) を有する細胞膜レセプターの C 末端配列を基にデザインされており、レセプターの C 末端に結合することにより、レセプターからのシグナルを調節する活性を有するペプチド、そのペプチド誘導体およびそれらの塩である。なお、本発明によるペプチド、そのペプチド誘導体およびそれらの塩は水和物となってもよい。より詳しくは、本発明の化合物は、レセプター C 末端結合蛋白への結合活性を有するか、または、レセプター C 末端結合蛋白が未知の場合も含めて、細胞内カルボキシ末端のアミノ酸配列が  $A_1-A_2-A_3$  である細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有する、少なくとも 3 個のアミノ酸配列を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$  (式中、 $X=A_1$  もしくは  $A_1$  と同一分類に属するアミノ酸； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=A_3$  もしくは  $A_3$  と同一分類に属するアミノ酸) のカルボキシ末端配列を有する化合物である。この様な、本発明の化合物としては、具体的には、例えば、C 末端配列が  $-S-L-V$  である Fas と PTP-BAS との結合を阻害する、少なくとも 3 個のアミノ酸を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$  (式中、 $X=L$ -セリン、 $L$ -スレオニン、あるいは  $L$ -システイン； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=L$ -バリン、あるいは  $L$ -イソロイシン) のカルボキシ末端配列を有するペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩をあげることができる。さらに、レセプター C 末端結合蛋白が未知の場合の例として、C 末端配列が  $-S-L-V$  である VIP レセプターの機能を阻害する、少なくとも 3 個のアミノ酸を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$  (式中、 $X=L$ -セリン、 $L$ -スレオニン、あるいは  $L$ -システイン； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=L$ -バリン、あるいは  $L$ -イソロイシン) のカルボキシ末端配列を有するペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩をあげることができる。また、レセプター C 末端配列が  $-S-X-V$  モチーフを持たない場合の例として、C 末端配列が  $-S-L-L$  である  $\beta_2$ -アドレナジックレセプターのシグナル伝達能を阻害する、少なくとも 3 個のアミノ酸を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$  (式中、 $X=L$ -セリン、 $L$ -スレオニン、あるいは  $L$ -システイン； $Y=L$ -アミノ酸あるいはグリシン； $Z=L$ -ロイシン) のカルボキシ末端配列を有するペプチド、その誘導体、およびそれらの薬学的に容認される塩をあげることができる。他に、レセプター C 末端配列が  $-T-T-L$  である IL-8 レセプターのシグナル伝達

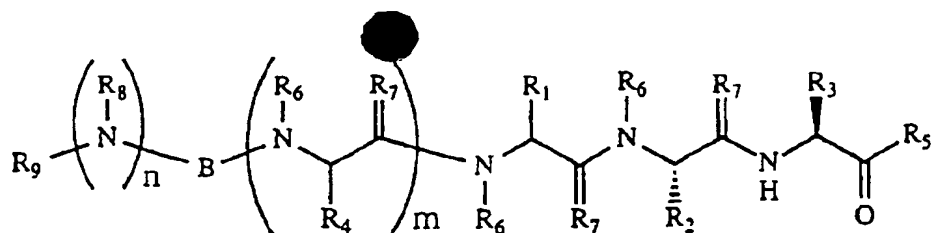
death induction for human carcinoma of the colon cell DLD-1 of Ph-NHCO-SLV-OEt. Figure 12 is graph which shows action of Ph-NHCO-SLV-OEt for the relaxation of VIP dependent bronchium. Figure 13 is graph which shows action of Ph-NHCO-SLA-OEt for the relaxation of VIP dependent bronchium. Figure 14 is graph which shows action of Ph-NHCO-SLL-OEt for the relaxation of VIP dependent bronchium. Figure 15 is graph which shows action of Ph-NHCO-SLV-OH for the relaxation of VIP dependent bronchium. Figure 16 is graph which shows action of Ph-NHCO-SLL-OEt for the relaxation of ISO dependent bronchium. Figure 17 is graph which shows action of Ph-NHCO-SLA-OEt for the relaxation of ISO dependent bronchium. Figure 18 is graph which shows action of Ph-NHCO-SLV-OEt for the relaxation of ISO dependent bronchium. It is a peptide, peptide derivative and those salt which possess activity which adjusts signal from receptor by fact that compound of the preferred embodiment I. compound of this invention this invention in order to execute invention design is done on basis of, C-terminal arrangement of cytoplasmic membrane receptor which possesses the signal regulating domain (RCR region) in C-terminal region competes to C-terminal of receptor. Furthermore, peptide, peptide derivative and those salt have been allowed to have become hydrate with this invention. furthermore as for details, as for compound of this invention, possessing binding activity to receptor C-terminal connection protein, or when, receptor C-terminal connection protein is unknown, including it possesses activity which adjusts function of cytoplasmic membrane receptor where amino acid sequence of intracellular carboxy end is the-  $A_1-A_2-A_3$ , it is a compound which possesses amino acid sequence of at least 3 in the longitudinal direction, possesses carboxy terminal sequence of  $-X-Y-Z$  (In Formula, as  $X=A_1$  or  $A_1$  amino acid which belongs to the same classification;  $Y=L$ -amino acid or glycine; it belongs to same classification as  $Z=A_3$  or  $A_3$  amino acid). This kind of compound of this invention, connection with the Fas and PTP-BAS where concretely, for example C-terminal arrangement is the-  $S-L-V$  is obstructed, it possesses amino acid of at least 3 in longitudinal direction, it increases salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which possess carboxy terminal sequence of  $-X-Y-Z$  (In Formula,  $X=L$ -serine,  $L$ -threonine or  $L$ -cysteine;  $Y=L$ -amino acid or glycine;  $Z=L$ -valine or  $L$ -isoleucine), it is possible densely. Function of VIP receptor where C-terminal arrangement is  $-S-L-V$  furthermore, as example when receptor C-terminal connection protein is unknown, is obstructed, it possesses amino acid of at least 3 in longitudinal direction, it increases salt which is admitted in peptide, its derivative, and those pharmacological which possess carboxy terminal sequence of  $-X-Y-Z$  (In Formula,  $X=L$ -serine,  $L$ -threonine or  $L$ -cysteine;  $Y=L$ -amino acid or glycine;  $Z=L$ -valine or  $L$ -isoleucine), it is possible densely.

を阻害する、少なくとも3個のアミノ酸を長さ方向に有し、 $-X-Y-Z$  (式中、 $X=L$  - セリン、 $L$  - スレオニン、あるいは $L$  - システイン； $Y=L$  - アミノ酸あるいはグリシン； $Z=L$  - ロイシン) のカルボキシ末端配列を有するペプチド、それらの誘導体、および、その薬学的に容認される塩も例としてあげることができる。

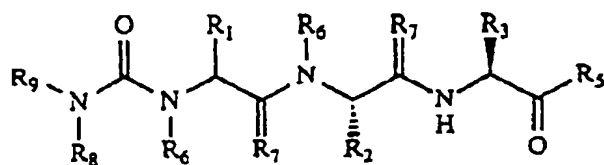
本発明の化合物において、細胞膜レセプターの機能を調節する活性の観点から、長さ方向に3から8個のアミノ酸を有するものが好ましいといえる。このような細胞膜レセプターC末端機能調節剤の具体的な例として、 $Fas/PTP-BAS$  結合阻害剤に関しては、ペプチドが長さ方向に6個以上あれば15個のペプチドと同程度の活性を有し、長さ方向に3個あれば4個及び5個と同程度の活性を有することが確認されている。一般的に、ペプチド鎖長が短くなるほど生物学的組織内へのペプチドの取り込みが容易となり、その結果取り込み数が増えるようになるため、活性発現以前にペプチドが破壊されたり、生物学的に無効になる見込みが少なくなることから、本発明化合物のペプチド鎖長は3であることが好ましい。

本発明化合物において、細胞膜レセプターC末端機能調節剤のペプチド配列 $-X-Y-Z$ で、 $Y=D$  - アミノ酸の場合は殆ど機能調節活性を有さず、 $Y=L$  - アミノ酸あるいはグリシンであることが好ましい (ただし、そのアミノ酸残基の種類によってあまり該活性は左右されない。例えば、 $Fas/PTP-BAS$  結合阻害剤においては、 $Y=D$  - ロイシンでは全く活性がないが、 $Y=$ 全ての $L$  - アミノ酸およびグリシンでは高い活性を有する)。また、本発明は、細胞内で代謝的に安定で (即ち、優れた生物学的安定性を有し)、より優れたレセプターシグナル調節活性を有するペプチド誘導体に関する。本発明者は、 $Fas/PTP-BAS$  結合阻害活性を有するペプチドの薬理学的性質の向上を目指し、種々誘導体を合成してみたところ、驚くべきことに、N末端のアミノ基を疎水性基で修飾した化合物に、疎水性の向上に加え、上記活性の著しい増強が認められることを見出した。このような化合物としては下式4：

signal transduction talent of 2 - adding L - nadic receptor where C-terminal arrangement is the - S - L - L as example when and receptor C-terminal arrangement do not have the tSXV motif, is obstructed, it possesses amino acid of at least 3 in the longitudinal direction, it increases salt which is admitted in peptide, the its derivative, and those pharmacological which possess carboxy terminal sequence of - X - Y - Z (In Formula,  $X=L$  - serine,  $L$  - threonine or  $L$  - cysteine;  $Y=L$  - amino acid or glycine;  $Z=L$  - leucine), it is possible densely. In other things, signal transduction of IL - 8 receptor where receptor C-terminal arrangement is - T - T - L is obstructed, it possesses amino acid of at least 3 in the longitudinal direction, also peptide, those derivative, and is admitted in pharmacological the salt which possess carboxy terminal sequence of - X - Y - Z (In Formula,  $X=L$  - serine,  $L$  - threonine or  $L$  - cysteine;  $Y=L$  - amino acid or glycine;  $Z=L$  - leucine) making example, it is possible densely. In compound of this invention, you can say that from viewpoint of the activity which adjusts function of cytoplasmic membrane receptor, in longitudinal direction those where 8 has amino acid are desirable from 3. As concrete example of this kind of cytoplasmic membrane receptor C-terminal functional regulation agent, in regard to Fas/PTP - BAS binding inhibitor, if the peptide 6 or more is in longitudinal direction, 15 it possesses activity of the peptide and same extent, if 3 it is in longitudinal direction, 4 and 5 and it possesses activity of same extent, it is verified densely. Generally, taking in peptide to inside extent biological tissue where peptide chain length becomes short becomes easy, because it reaches point where the frequency of result taking in increases, from fact that the possibility that peptide is destroyed before activity expression, in biological becomes invalid decreases, peptide chain length of the compound of this invention is 3, it is desirable densely. In the compound of this invention, with peptide sequence - X - Y - Z of cytoplasmic membrane receptor C-terminal functional regulation agent, in case of  $Y=D$  - amino acid almost it does not possess functional regulation activity, densely desirable (However, said activity is not influenced excessively with types of the amino acid residue. Regarding for example Fas/PTP - BAS binding inhibitor, with  $Y=D$  - leucine completely there is not a activity. With  $Y=$  all  $L$  - amino acid and glycine it possesses high activity.) where it is a  $Y=L$  - amino acid or a glycine. and this invention with intracellular in metabolic (Namely, biological stability which is superior to possess), regard the peptide derivative which possesses receptor signal adjustment activity which is superior instability. these inventors aims toward improvement of pharmacological property of peptide which possesses Fas/PTP - BAS binding inhibition, when it tries synthesizing various derivative, in the surprising fact, in compound which decorates amino group of N terminal with the hydrophobic group, can recognize reinforcement where above-mentioned activity is considerable in addition to hydrophobic improvement, you discovered densely. As this kind of compound formula below 4:



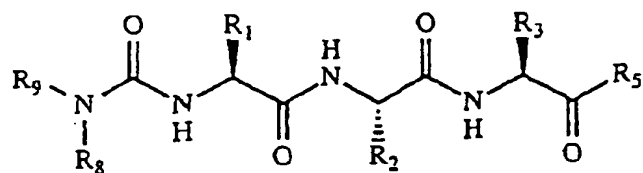
[式中、 $R_1 = A_1$ もしくは $A_1$ と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = A_3$ もしくは $A_3$ と同一分類に属するアミノ酸の側鎖構造を意味し、 $R_4$ は任意のアミノ酸の側鎖構造であり、 $R_5$ は置換あるいは非置換である $C_1$ 乃至 $C_6$ の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基であるか、または水酸基であり、各 $R_6$ は個々に水素あるいはメチル基であり、各 $R_7$ は個々に水素あるいは酸素であり、 $B$ はカルボニル基あるいは直接結合であり、 $R_8$ および $R_9$ はそれぞれ水素、あるいは置換もしくは非置換アルキル基、または置換もしくは非置換芳香族基であり、この場合アルキル基は直鎖、分鎖、または環状であり、 $m$ は0乃至12であり、 $n$ は0あるいは1であり、さらに $n$ が1の場合は $R_8$ と $R_9$ は一緒になって環を形成してもよい；ただし、 $R_6$ および $R_9$ は同時に水素ではない]で表されるものがある。好ましいものとしては、下式5：



[式中、 $R_1 = L$ -セリンもしくは $L$ -スレオニンの側鎖構造； $R_2 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3 = L$ -アミノ酸の側鎖構造あるいは水素を意味し、 $R_5$ 、 $R_6$ 、 $R_7$ 、 $R_8$ および $R_9$ は前述と同義である；ただし、 $R_1$ がセリンの側鎖であり、かつ $R_2$ がメチオニンの側鎖であり、かつ $R_3$ がグルタミンの側鎖である場合を除く]で表されるものをあげることができる。さらに好ましいものとしては下式6：

You can list those which are displayed with [In Formula, as  $R_1 = A_1$  or  $A_1$  belongs to same classification side chain structure of amino acid which; side chain structure or hydrogen of  $R_2 = L$ -amino acid; As  $R_3 = A_3$  or  $A_3$  side chain structure of amino acid which belongs to the same classification is meant, As for  $R_4$  with side chain structure of amino acid of option, As for  $R_5$  is a substituted or unsubstituted straight chain of  $C_1$  to  $C_6$  which, Amount chain, Or it is an alkoxy group of cyclic, Or with hydroxy group, As for each  $R_6$  individually with hydrogen or methyl group, As for each  $R_7$  individually with hydrogen or oxygen, As for  $B$  with carbonyl group or direct bond, As for  $R_8$  and  $R_9$  with respective hydrogen, or substitution or the unsubstituted alkyl group or substitution or unsubstituted aromatic group, in this case as for alkyl group with the straight chain, amount chain, or cyclic, as for  $m$  with the 0 to 12, as for  $n$  when with 0 or 1, furthermore the  $n$  is 1, as for  $R_8$  and  $R_9$  becoming simultaneous, forming ring, good; However,  $R_6$  and  $R_9$  it is a hydrogen simultaneously, ]. As desirable ones, formula below 5:

Those which are displayed with [In Formula, side chain structure of  $R_1 = L$ -serine or  $L$ -threonine; side chain structure or the hydrogen of  $R_2 = L$ -amino acid; side chain structure or hydrogen of  $R_3 = L$ -amino acid is meant, the  $R_5$ ,  $R_6$ ,  $R_7$  and  $R_8$  and  $R_9$  earlier description and are synonymous; however,  $R_1$  with side chain of serine, at the same time  $R_2$  with side chain of methionine, when at the same time the  $R_3$  is side chain of glutamine you exclude] are increased, it is possible densely. furthermore as desirable ones formula below 6:



[式中、 $R_1$ =L-セリンもしくはL-スレオニンの側鎖構造； $R_2$ =L-アミノ酸の側鎖構造あるいは水素； $R_3$ =L-バリン、L-イソロイシンあるいはL-ロイシンの側鎖構造を意味し、 $R_5$ 、 $R_8$ および $R_9$ は前述と同義である]で表わされるものをあげることができる。上記式4、式5および式6において $R_8$ あるいは $R_9$ の一方が置換もしくは非置換アルキル基または置換もしくは非置換芳香族基であるものが好ましく、この場合アルキル基は直鎖、分鎖または環状であり、上記式4においては、さらに好ましくは、 $n$ が1でありBがカルボニル基である疎水性置換基を有するウレイドタイプの修飾基をあげることができる。これらの化合物のN末端に位置する好ましい置換基の具体例としてはアセチル基、より好ましい具体例としては、置換もしくは非置換のシクロアルキルアミノカルボニル基、置換もしくは非置換のフェニルアミノカルボニル基ならびに置換もしくは非置換の環状アミノカルボニル基をあげることができる。ただし、ここで述べるシクロアルキルおよび環状アミノは3～8員の環状構造を意味する。一方、C末端のカルボキシル基のエステル化は疎水性の増大により、それら誘導体の生物学的組織内への取り込みを増大させることが期待される。その様な化合物としては、上記式中、 $R_5$ が置換あるいは非置換である $C_1$ 乃至 $C_6$ の直鎖、分鎖、または環状のアルコキシ基である化合物をあげることができる。実際、Fas/PTP-BAS結合阻害剤においてC末端を修飾したペプチド誘導体は、インビトロでのFas/PTP-BAS結合阻害活性は低下するがヒトのガン細胞への作用を調べた試験において、該細胞への細胞死誘導能の著しい向上が認められた。さらに、本発明の化合物としては、結合阻害ペプチドの生物学的組織内における安定性を目指した修飾体、例えば、D-アミノ酸による置換体、N-メチルアミノ酸による置換、あるいはアミド結合の還元体なども含まれる。具体的には、上記式中において $R_6$ の少なくとも一つがメチル基である化合物、もしくは、 $R_1$ あるいは $R_4$ を側鎖に有する炭素の立体配置の少なくともひとつが、S配置あるいはR配置である化合物、あるいは、 $R_7$ の少なくとも一つが水素である化合物をあげることができる。これらの修飾体はFasとPTP-BASとの結合を阻害する活性を有する。これらのN末端あるいはC末端の修飾は、Fas/PTP-BAS結合阻害系においてだけでなく、他の細胞あるいは組織を用いたレセプターシグナルの調節系においても有効である。具体的な例として、VIPレセプターのシグナル伝達阻害剤や $\beta_2$ -アドレナジックレセ




プターのシグナル伝達阻害系において、例えば、N末をフェニルアミノカルボニル化し、●端をエステル化している化合物が活性を示した。また、本発明は細胞膜レセプターC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより細胞膜レセプターのシグナルを調節する方法、および細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療方法にも関するものであるが、その実施の態様として具体的には、例えば、FasとPTP-BASとの結合を阻害することにより、癌細胞に細胞死を誘導する方法、および細胞死を誘導する化合物の化学療法的利用を挙げることができる。後述の参考例において示したように、正常大腸組織にはPTP-BASの発現が認められないにもかかわらず、大腸癌では8株中5株にPTP-BASの発現が認められるということが本発明者らにより初めて発見された。この事実は、ある種の癌細胞はPTP-BASを発現することにより該細胞自体の死を回避している可能性があることを示している。本発明者らは、このような癌細胞においてPTP-BASが過剰発現しているという知見に基づき、更に鋭意研究を重ねた結果、PTP-BASのFasへの結合を阻害することにより、PTP-BASによる癌細胞の細胞死の回避を抑制し、癌細胞に死を誘導することが可能であることを更に発見した。すなわち、本発明者らは、ある種の癌細胞においてPTP-BASの発現が正常レベルより顕著に増加していることから、本発明のFas/PTP-BAS結合阻害剤を添加することにより、癌細胞の抗Fas抗体に対する感受性を上昇させることを見出した。これらの発見は本発明のFas/PTP-BAS結合阻害剤が癌化学療法に有効であることを示すものである。生体中にFasリガンドを発現している細胞傷害性T細胞は存在しており、従って、本発明のFas/PTP-BAS結合阻害剤により、細胞死シグナルの抑制を解除するだけで、癌細胞に死を誘導することが可能である。よって、本発明は、癌患者に本発明の化合物を単独で投与することからなる癌細胞に細胞死を誘導する方法を含むが、それに限定されるものではなく、本発明の化合物と共に抗Fas抗体やFasリガンドとの併用による上記方法をも含むものとする。その際用いる化合物の用量を調節することにより、PTP-BASのFasへの結合活性を低減もしくは完全に阻害することが可能である。化合物の用量を調節することによるPTP-BASのFasへの結合活性の低減は、起こりうる好ましくない副作用を除去するのに有効である。このように本発明の化合物は、蛋白質脱リン酸化酵素であるPTP-BASのFasへの結合阻害剤として有効である。PTP-BASが認識するペプチドは後述の参考例から明らかのように特異性が強く、それ故、本発明の化合物は、一般的な蛋白質脱リン酸化酵素阻害剤の場合よりも副作用が少ないであろうと推察される。本発明において、本文中に何ら記載のない限り、以下に示すように慣用の1文字表記でアミノ酸を示すものとする。アラニン(A)、アルギニン(R)、アスパラギン(N)、アスパラギン酸(D)、システイン(C)、グルタミン(G)

、グルタミン酸 (E)、グリシン (G)、ヒスチジン (H)、イソロイシン (I)、ロイシン (L)、リジン (K)、メチオニン (M)、フェニルアラニン (F)、プロリン (P)、セリン (S)、スレオニン (T)、トリプトファン (W)、チロシン (Y)、バリン (V)。ただし、いずれかのアミノ酸あるいはアミノ酸残基を表す場合には記号 (X) を用いる。また、本発明において、アミノ酸の分類をその  $\alpha$  炭素上の側鎖の疎水性、親水性、電荷、および水素結合性により以下のように定めるが、側鎖の物理・化学的性質によってひとつのアミノ酸が複数の分類に属することが可能である。すなわち、本発明における「同一分類に属するアミノ酸」は、複数の分類のアミノ酸を同時にさす場合が包含される。なお、本発明における「アミノ酸」としては、天然型のものに限定されることなく、非天然型のものも含まれる。非天然型アミノ酸としては、例えば、ホモセリン、 $\beta$ -ヒドロキシバリン、O-4-ヒドロキシフェニルチロシン、 $\alpha$ -t-ブチルグリシン、2-アミノ酪酸、 $\alpha$ -シクロヘキシルグリシン、 $\alpha$ -フェニルグリシンをあげることができる。疎水性アミノ酸：A、R、N、Q、E、I、L、K、M、F、P、W、Y、V 親水性アミノ酸：R、N、D、C、Q、E、H、K、S、T、Y 正電荷アミノ酸：R、H、K 負電荷アミノ酸：D、E 水素結合性アミノ酸：R、N、D、C、Q、E、H、K、M、S、T、Y さらに、アミノ酸以外の置換基の略号については、アセチル基 (Ac)、メチル基 (Me)、エチル基 (Et)、イソプロピル基 (iPr)、フェニル基 (Ph)、シクロヘキシル基 (Cyh) をもって表す。本発明の化合物の具体例としては以下に示すものがあげられる：(1) tSXXXa) N末アセチル、C末フリー体：Ac-SXA、Ac-SXC、Ac-SXD、Ac-SXE、Ac-SXF、Ac-SXG、Ac-SXH、Ac-SXI、Ac-SXK、Ac-SXL、Ac-SXM、Ac-SXN、Ac-SXP、Ac-SXQ、Ac-SXR、Ac-SXS、Ac-SXT、Ac-SXV、Ac-SXW、Ac-SXY。Ac-TXA、Ac-TXC、Ac-TXD、Ac-TXE、Ac-TXF、Ac-TXG、Ac-TXH、Ac-TXI、Ac-TXK、Ac-TXL、Ac-TXM、Ac-TXN、Ac-TXP、Ac-TXQ、Ac-TXR、Ac-TXS、Ac-TXT、Ac-TXV、Ac-TXW、Ac-TXY。b) N末アセチル、C末エステル体：Ac-SXA-OEt、Ac-SXC-OEt、Ac-SXD-OEt、Ac-SXE-OEt、Ac-SXF-OEt、Ac-SXG-OEt、Ac-SXH-OEt、Ac-SXI-OEt、Ac-SXK-OEt、Ac-SXL-OEt、Ac-SXM-OEt、Ac-SXN-OEt、Ac-SXP-OEt、Ac-SXQ-OEt、Ac-SXR-OEt、Ac-SXS-OEt、Ac-SXT-OEt、Ac-SXV-OEt、Ac-SXW-OEt、Ac-SXY-OEt。Ac-TXA-OEt、Ac-TXC-OEt、Ac-TXD-OEt、Ac-TXE-OEt、Ac-TXF-OEt、Ac-T

XG-OEt, Ac-TXH-O $\bullet$  Ac-TXI-OEt, Ac-TXK-OEt, Ac-TXL-OEt, Ac-TXM-OEt, Ac-TXN-OEt, Ac-TXP-OEt, Ac-TXQ-OEt, Ac-TXR-OEt, Ac-TXS-OEt, Ac-TXT-OEt, Ac-TXV-OEt, Ac-TXW-OEt, Ac-TXY-OEt. c) N末フェニルアミノカルボニル, C末フリー体: Ph-NHCO-SXA, Ph-NHCO-SXC, Ph-NHCO-SXD, Ph-NHCO-SXE, Ph-NHCO-SXF, Ph-NHCO-SXG, Ph-NHCO-SXH, Ph-NHCO-SXI, Ph-NHCO-SXK, Ph-NHCO-SXL, Ph-NHCO-SXM, Ph-NHCO-SXN, Ph-NHCO-SXP, Ph-NHCO-SXQ, Ph-NHCO-SXR, Ph-NHCO-SXS, Ph-NHCO-SXT, Ph-NHCO-SXV, Ph-NHCO-SXW, Ph-NHCO-SXY, Ph-NHCO-TXA, Ph-NHCO-TXC, Ph-NHCO-TXD, Ph-NHCO-TXE, Ph-NHCO-TXF, Ph-NHCO-TXG, Ph-NHCO-TXH, Ph-NHCO-TXI, Ph-NHCO-TXK, Ph-NHCO-TXL, Ph-NHCO-TXM, Ph-NHCO-TXN, Ph-NHCO-TXP, Ph-NHCO-TXQ, Ph-NHCO-TXR, Ph-NHCO-TXS, Ph-NHCO-TXT, Ph-NHCO-TXV, Ph-NHCO-TXW, Ph-NHCO-TXY. d) N末フェニルアミノカルボニル, C末エステル体: Ph-NHCO-SXA-OEt, Ph-NHCO-SXC-OEt, Ph-NHCO-SXD-OEt, Ph-NHCO-SXE-OEt, Ph-NHCO-SXF-OEt, Ph-NHCO-SXG-OEt, Ph-NHCO-SXH-OEt, Ph-NHCO-SXI-OEt, Ph-NHCO-SXK-OEt, Ph-NHCO-SXL-OEt, Ph-NHCO-SXM-OEt, Ph-NHCO-SXN-OEt, Ph-NHCO-SXP-OEt, Ph-NHCO-SXQ-OEt, Ph-NHCO-SXR-OEt, Ph-NHCO-SXS-OEt, Ph-NHCO-SXT-OEt, Ph-NHCO-SXV-OEt, Ph-NHCO-SXW-OEt, Ph-NHCO-SXY-OEt, Ph-NHCO-TXA-OEt, Ph-NHCO-TXC-OEt, Ph-NHCO-TXD-OEt, Ph-NHCO-TXE-OEt, Ph-NHCO-TXF-OEt, Ph-NHCO-TXG-OEt, Ph-NHCO-TXH-OEt, Ph-NHCO-TXI-OEt, Ph-NHCO-TXK-OEt, Ph-NHCO-TXL-OEt, Ph-NHCO-TXM-OEt, Ph-NHCO-TXN-OEt, Ph-NHCO-TXP-OEt, Ph-NHCO-TXQ-OEt, Ph-NHCO-TXR-OEt, Ph-NHCO-TXS-OEt, Ph-NHCO-TXT-OEt, Ph-NHCO-TXV-OEt, Ph-NHCO-TXW-OEt, Ph-NHCO-TXY

-OEt. e) N末シクロヘキシルアミノカルボニル体  
 : Cyh-NHCO-SXV, Cyh-NHCO-TX  
 V, Cyh-NHCO-SXI, Cyh-NHCO-T  
 XI, Cyh-NHCO-SXL, Cyh-NHCO-  
 TXL, Cyh-NHCO-SXV-OEt, Cyh-  
 NHCO-TXV-OEt, Cyh-NHCO-SXI  
 -OEt, Cyh-NHCO-TXI-OEt, Cyh  
 -NHCO-SXL-OEt, Cyh-NHCO-TX  
 L-OEt. (2) tSLV a) N末フリー、C末フリ  
 ー体: RNEIQSLV, NEIQSLV, EIQSL  
 V, IQSLV, QSLV, SLV. b) N末アセチル  
 、C末フリー体: Ac-RNEIQSLV, Ac-NE  
 IQSLV, Ac-EIQSLV, Ac-IQSLV,  
 Ac-QSLV, Ac-SLV, Ac-CLV, Ac-  
 TLV. c) N末アセチル、C末エステル体: Ac-E  
 IQSLV-OEt, Ac-IQSLV-OEt, Ac  
 -SLV-OMe, Ac-SLV-OEt, Ac-SL  
 V-OiPr, Ac-CLV-OMe, Ac-TLV-  
 OMe, Ac-TLV-OEt, Ac-TLV-OiP  
 r. d) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体  
 : Ph-NHCO-SLV, Ph-NHCO-CLV,  
 Ph-NHCO-TLV. e) N末フェニルアミノカル  
 ボニル、C末エステル体: Ph-NHCO-SLV-O  
 Me, Ph-NHCO-CLV-OMe, Ph-NHC  
 O-TLV-OMe, Ph-NHCO-SLV-OEt  
 , Ph-NHCO-CLV-OEt, Ph-NHCO-  
 TLV-OEt, Ph-NHCO-SLV-OiPr,  
 Ph-NHCO-CLV-OiPr, Ph-NHCO-  
 TLV-OiPr. f) N末シクロヘキシルアミノカル  
 ボニル、C末フリー体: Cyh-NHCO-SLV, C  
 yh-NHCO-CLV, Cyh-NHCO-TLV.  
 g) N末シクロヘキシルアミノカルボニル、C末エステ  
 ル体: Cyh-NHCO-SLV-OMe, Cyh-N  
 HCO-CLV-OMe, Cyh-NHCO-TLV-  
 OMe, Cyh-NHCO-SLV-OEt, Cyh-  
 NHCO-CLV-OEt, Cyh-NHCO-TLV  
 -OEt, Cyh-NHCO-SLV-OiPr, Cy  
 h-NHCO-CLV-OiPr, Cyh-NHCO-  
 TLV-OiPr. h) N末フェニルカルボニル、C末  
 フリー体: Ph-CO-SLV, Ph-CO-CLV,  
 Ph-CO-TLV. i) N末フェニルカルボニル、C  
 末エステル体: Ph-CO-SLV-OMe, Ph-C  
 O-CLV-OMe, Ph-CO-TLV-OMe, P  
 h-CO-SLV-OEt, Ph-CO-CLV-OE  
 t, Ph-CO-TLV-OEt. j) N末シクロヘキ  
 シルカルボニル、C末フリー体: Cyh-CO-SLV  
 , Cyh-CO-CLV, Cyh-CO-TLV. k)  
 N末シクロヘキシルカルボニル、C末エステル体: Cy  
 h-CO-SLV-OMe, Cyh-CO-CLV-O  
 Me, Cyh-CO-TLV-OMe, Cyh-CO-  
 SLV-OEt, Cyh-CO-CLV-OEt, Cy  
 h-CO-TLV-OEt. l) 還元体: Ac-S-ψ  
 -(CH<sub>2</sub>NH)-LV, Ac-SL-ψ-(CH<sub>2</sub>NH

) -V, Ac-S-ψ-(CH<sub>2</sub>)-LV-OMe,  
 Ac-SL-ψ-(CH<sub>2</sub>NH)-V-OMe, Ac-S  
 -ψ-(CH<sub>2</sub>NH)-LV-OEt, Ac-SL-ψ  
 -(CH<sub>2</sub>NH)-V-OEt. m) Nメチル体: Ac-  
 (NMe)SLV, Ac-S-(NMe)LV, Ac-  
 (NMe)SLV-OMe, Ac-S-(NMe)LV  
 -OMe. n) D体: Ac-(D)SLV, Ac-(D  
 )SLV-OMe. o) SLI誘導体: Ac-SLI,  
 Ac-SLI-OMe, Ac-SLI-OEt, Ac-  
 SLI-OiPr, Ph-NHCO-SLI, Ph-N  
 HCO-SLI-OMe, Ph-NHCO-SLI-O  
 Et, Ph-NHCO-SLI-OiPr. p) SLA  
 誘導体: Ac-SLA, Ac-SLA-OMe, Ac-  
 SLA-OEt, Ph-NHCO-SLA, Ph-NH  
 CO-SLA-OMe, Ph-NHCO-SLA-OE  
 t, Ph-NHCO-SLA-OiPr. (3) 他<sup>t</sup>  
SXVa) N末アセチル, C末フリー体: Ac-SAV  
 , Ac-SCV, Ac-SDV, Ac-SEV, Ac-  
 SFV, Ac-SGV, Ac-SHV, Ac-SIV,  
 Ac-SKV, Ac-SMV, Ac-SNV, Ac-S  
 PV, Ac-SQV, Ac-SRV, Ac-SSV, A  
 c-STV, Ac-SVV, Ac-SWV, Ac-SY  
 V, Ac-TAV, Ac-TCV, Ac-TDV, Ac  
 -TEV, Ac-TFV, Ac-TGV, Ac-THV  
 , Ac-TIV, Ac-TKV, Ac-TMV, Ac-  
 TNV, Ac-TPV, Ac-TQV, Ac-TRV,  
 Ac-TSV, Ac-TTV, Ac-TVV, Ac-T  
 WV, Ac-TYV. b) N末アセチル, C末エステル  
 体: Ac-SAV-OMe, Ac-SCV-OMe, A  
 c-SDV-OMe, Ac-SEV-OMe, Ac-S  
 FV-OMe, Ac-SGV-OMe, Ac-SHV-  
 OMe, Ac-SIV-OMe, Ac-SKV-OMe  
 , Ac-SMV-OMe, Ac-SNV-OMe, Ac  
 -SPV-OMe, Ac-SQV-OMe, Ac-SR  
 V-OMe, Ac-SSV-OMe, Ac-STV-O  
 Me, Ac-SVV-OMe, Ac-SWV-OMe,  
 Ac-SYV-OMe, Ac-TAV-OMe, Ac-  
 TCV-OMe, Ac-TDV-OMe, Ac-TEV  
 -OMe, Ac-TFV-OMe, Ac-TGV-OM  
 e, Ac-THV-OMe, Ac-TIV-OMe, A  
 c-TKV-OMe, Ac-TMV-OMe, Ac-T  
 NV-OMe, Ac-TPV-OMe, Ac-TQV-  
 OMe, Ac-TRV-OMe, Ac-TSV-OMe  
 , Ac-TTV-OMe, Ac-TVV-OMe, Ac  
 -TWV-OMe, Ac-TYV-OMe, Ac-SA  
 V-OEt, Ac-SCV-OEt, Ac-SDV-O  
 Et, Ac-SEV-OEt, Ac-SFV-OEt,  
 Ac-SGV-OEt, Ac-SHV-OEt, Ac-  
 SIV-OEt, Ac-SKV-OEt, Ac-SMV  
 -OEt, Ac-SNV-OEt, Ac-SPV-OE  
 t, Ac-SQV-OEt, Ac-SRV-OEt, A  
 c-SSV-OEt, Ac-STV-OEt, Ac-S  
 VV-OEt, Ac-SWV-OEt, Ac-SYV-

OEt, Ac-TAV-OEt, -TCV-OEt  
 , Ac-TDV-OEt, Ac-TEV-OEt, Ac-  
 -TFV-OEt, Ac-TGV-OEt, Ac-TH  
 V-OEt, Ac-TIV-OEt, Ac-TKV-O  
 Et, Ac-TMV-OEt, Ac-TNV-OEt,  
 Ac-TPV-OEt, Ac-TQV-OEt, Ac-  
 TRV-OEt, Ac-TSV-OEt, Ac-TTV  
 -OEt, Ac-TVV-OEt, Ac-TWV-OE  
 t, Ac-TYV-OEt. c) N末フェニルアミノカ  
 ルボニル, C末フリー体: Ph-NHCO-SAV, P  
 h-NHCO-SCV, Ph-NHCO-SDV, Ph  
 -NHCO-SEV, Ph-NHCO-SFV, Ph-  
 NHCO-SGV, Ph-NHCO-SHV, Ph-N  
 HCO-SIV, Ph-NHCO-SKV, Ph-NH  
 CO-SMV, Ph-NHCO-SNV, Ph-NHC  
 O-SPV, Ph-NHCO-SQV, Ph-NHCO  
 -SRV, Ph-NHCO-SSV, Ph-NHCO-  
 STV, Ph-NHCO-SVV, Ph-NHCO-S  
 WV, Ph-NHCO-SYV, Ph-NHCO-TA  
 V, Ph-NHCO-TCV, Ph-NHCO-TDV  
 , Ph-NHCO-TEV, Ph-NHCO-TFV,  
 Ph-NHCO-TGV, Ph-NHCO-THV, P  
 h-NHCO-TIV, Ph-NHCO-TKV, Ph  
 -NHCO-TMV, Ph-NHCO-TNV, Ph-  
 NHCO-TPV, Ph-NHCO-TQV, Ph-N  
 HCO-TRV, Ph-NHCO-TSV, Ph-NH  
 CO-TTV, Ph-NHCO-TVV, Ph-NHC  
 O-TWV, Ph-NHCO-TYV. d) N末フェニ  
 ルアミノカルボニル, C末エステル体: Ph-NHCO  
 -SAV-OEt, Ph-NHCO-SCV-OEt,  
 Ph-NHCO-SDV-OEt, Ph-NHCO-S  
 EV-OEt, Ph-NHCO-SFV-OEt, Ph  
 -NHCO-SGV-OEt, Ph-NHCO-SHV  
 -OEt, Ph-NHCO-SIV-OEt, Ph-N  
 HCO-SKV-OEt, Ph-NHCO-SMV-O  
 Et, Ph-NHCO-SNV-OEt, Ph-NHC  
 O-SPV-OEt, Ph-NHCO-SQV-OEt  
 , Ph-NHCO-SRV-OEt, Ph-NHCO-  
 SSV-OEt, Ph-NHCO-STV-OEt, P  
 h-NHCO-SVV-OEt, Ph-NHCO-SW  
 V-OEt, Ph-NHCO-SYV-OEt, Ph-  
 NHCO-TAV-OEt, Ph-NHCO-TCV-  
 OEt, Ph-NHCO-TDV-OEt, Ph-NH  
 CO-TEV-OEt, Ph-NHCO-TFV-OE  
 t, Ph-NHCO-TGV-OEt, Ph-NHCO  
 -THV-OEt, Ph-NHCO-TIV-OEt,  
 Ph-NHCO-TKV-OEt, Ph-NHCO-T  
 MV-OEt, Ph-NHCO-TNV-OEt, Ph  
 -NHCO-TPV-OEt, Ph-NHCO-TQV  
 -OEt, Ph-NHCO-TRV-OEt, Ph-N  
 HCO-TSV-OEt, Ph-NHCO-TTV-O  
 Et, Ph-NHCO-TVV-OEt, Ph-NHC  
 O-TWV-OEt, Ph-NHCO-TYV-OEt

。(4) tSXL a) N末アセチル、C末フリー体: Ac-SCL, Ac-SFL, Ac-SGL, Ac-SHL, Ac-SLL, Ac-SSL, Ac-SVL, Ac-SYL, Ac-TGL, Ac-TLL, Ac-TTL, Ac-TVL。b) N末アセチル、C末エステル体: Ac-SCL-OEt, Ac-SFL-OEt, Ac-SGL-OEt, Ac-SHL-OEt, Ac-SLL-OEt, Ac-SSL-OEt, Ac-SVL-OEt, Ac-SYL-OEt, Ac-TGL-OEt, Ac-TLL-OEt, Ac-TTL-OEt, Ac-TVL-OEt, Ac-SLL-OMe, Ac-SLL-OiPr, Ac-TTL-OMe, Ac-TTL-OiPr。c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体: Ph-NHCO-SCL, Ph-NHCO-SFL, Ph-NHCO-SGL, Ph-NHCO-SHL, Ph-NHCO-SLL, Ph-NHCO-SSL, Ph-NHCO-SVL, Ph-NHCO-SYL, Ph-NHCO-TGL, Ph-NHCO-TLL, Ph-NHCO-TTL, Ph-NHCO-TVL。d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体: Ph-NHCO-SCL-OEt, Ph-NHCO-SFL-OEt, Ph-NHCO-SGL-OEt, Ph-NHCO-SHL-OEt, Ph-NHCO-SLL-OEt, Ph-NHCO-SSL-OEt, Ph-NHCO-SVL-OEt, Ph-NHCO-SYL-OEt, Ph-NHCO-TGL-OEt, Ph-NHCO-TLL-OEt, Ph-NHCO-TTL-OEt, Ph-NHCO-TVL-OEt, Ph-NHCO-SLL-OMe, Ph-NHCO-SLL-OiPr, Ph-NHCO-TTL-OMe, Ph-NHCO-TTL-OiPr。 (5) tSXA a) N末アセチル、C末フリー体: Ac-SDA, Ac-SSA, Ac-STA, Ac-SVA, Ac-TEA, Ac-TMA。b) N末アセチル、C末エステル体: Ac-SDA-OEt, Ac-SSA-OEt, Ac-STA-OEt, Ac-SVA-OEt, Ac-TEA-OEt, Ac-TMA-OEt。c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体: Ph-NHCO-SDA, Ph-NHCO-SSA, Ph-NHCO-STA, Ph-NHCO-SVA, Ph-NHCO-TEA, Ph-NHCO-TMA。d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体: Ph-NHCO-SDA-OEt, Ph-NHCO-SSA-OEt, Ph-NHCO-STA-OEt, Ph-NHCO-SVA-OEt, Ph-NHCO-TEA-OEt, Ph-NHCO-TMA-OEt。 (6) tSXC a) N末アセチル、C末フリー体: Ac-SDC, Ac-SLC, Ac-SMC, Ac-SSC, Ac-STC, Ac-SVC, Ac-TDC, Ac-TEC, Ac-TGC。b) N末アセチル、C末エステル体: Ac-SDC-OEt, Ac-SLC-OEt, Ac-SMC-OEt, Ac-SSC-OEt, Ac-STC-OEt, Ac-SVC-OEt, Ac-TDC-OEt, Ac-TEC-OEt, Ac-TGC-OEt。c) N末フ

エニルアミノカルボニル、C末フリー体: Ph-NHCO-SDC、Ph-NHCO-SMC、Ph-NHCO-SMC、Ph-NHCO-SSC、Ph-NHCO-STC、Ph-NHCO-SVC、Ph-NHCO-TDC、Ph-NHCO-TEC、Ph-NHCO-TGC。  
 d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体: Ph-NHCO-SDC-OEt、Ph-NHCO-SLC-OEt、Ph-NHCO-SMC-OEt、Ph-NHCO-SSC-OEt、Ph-NHCO-STC-OEt、Ph-NHCO-SVC-OEt、Ph-NHCO-TDC-OEt、Ph-NHCO-TEC-OEt、Ph-NHCO-TGC-OEt。(7) tSXDAc-SPD、Ac-SPD-OEt、Ph-NHCO-SPD、Ph-NHCO-SPD-OEt。(8) tSXEAAc-TME、Ac-TME-OEt、Ph-NHCO-TME、Ph-NHCO-TME-OEt。(9) tSXFa) N末アセチル、C末フリー体: Ac-SHF、Ac-SVF、Ac-TCF、Ac-TTF、Ac-TYF。b) N末アセチル、C末エステル体: Ac-SHF-OEt、Ac-SVF-OEt、Ac-TCF-OEt、Ac-TTF-OEt、Ac-TYF-OEt。c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体: Ph-NHCO-SHF、Ph-NHCO-SVF、Ph-NHCO-TCF、Ph-NHCO-TTF、Ph-NHCO-TYF。d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体: Ph-NHCO-SHF-OEt、Ph-NHCO-SVF-OEt、Ph-NHCO-TCF-OEt、Ph-NHCO-TTF-OEt、Ph-NHCO-TYF-OEt。(10) tSXGAAc-SRG、Ac-TRG、Ac-SRG-OEt、Ac-TRG-OEt、Ph-NHCO-SRG、Ph-NHCO-TRG、Ph-NHCO-SRG-OEt、Ph-NHCO-TRG-OEt。(11) tSXHAAc-SFH、Ac-SNH、Ac-SRH、Ac-SFH-OEt、Ac-SNH-OEt、Ac-SRH-OEt、Ph-NHCO-SFH、Ph-NHCO-SNH、Ph-NHCO-SRH、Ph-NHCO-SFH-OEt、Ph-NHCO-SNH-OEt、Ph-NHCO-SRH-OEt。(12) tSXIa) N末アセチル、C末フリー体: Ac-SGI、Ac-SMI、Ac-SPI、Ac-SVI、Ac-TDI、Ac-TKI、Ac-TNI。b) N末アセチル、C末エステル体: Ac-SGI-OEt、Ac-SMI-OEt、Ac-SPI-OEt、Ac-SVI-OEt、Ac-TDI-OEt、Ac-TKI-OEt、Ac-TNI-OEt。c) N末フェニルアミノカルボニル、C末フリー体: Ph-NHCO-SGI、Ph-NHCO-SMI、Ph-NHCO-SPI、Ph-NHCO-SVI、Ph-NHCO-TDI、Ph-NHCO-TKI、Ph-NHCO-TNI。d) N末フェニルアミノカルボニル、C末エステル体: Ph-NHCO-SGI-OEt、Ph-NHCO-SMI-OEt、Ph-NHCO-SPI-OEt、Ph-NHCO-SVI-OEt、Ph-NHCO-TDI-OEt、Ph-NHCO-TKI-OEt、Ph-NHCO-TNI-OEt。



I-OEt, Ph-NHCO-T-OEt, Ph-NHCO-TKI-OEt, Ph-NHCO-TNI-OEt. (13) tSXKa) N末アセチル, C末フリー体: Ac-SEK, Ac-SGK, Ac-SPK, Ac-SSK, Ac-TEK, Ac-TIK, Ac-TSK, Ac-TTK. b) N末アセチル, C末エステル体: Ac-SEK-OEt, Ac-SGK-OEt, Ac-SPK-OEt, Ac-SSK-OEt, Ac-TEK-OEt, Ac-TIK-OEt, Ac-TSK-OEt, Ac-TTK-OEt. c) N末フェニルアミノカルボニル, C末フリー体: Ph-NHCO-SEK, Ph-NHCO-SGK, Ph-NHCO-SPK, Ph-NHCO-SSK, Ph-NHCO-TEK, Ph-NHCO-TIK, Ph-NHCO-TSK, Ph-NHCO-TTK. d) N末フェニルアミノカルボニル, C末エステル体: Ph-NHCO-SEK-OEt, Ph-NHCO-SGK-OEt, Ph-NHCO-SPK-OEt, Ph-NHCO-SSK-OEt, Ph-NHCO-TEK-OEt, Ph-NHCO-TIK-OEt, Ph-NHCO-TSK-OEt, Ph-NHCO-TTK-OEt. (14) tSXMAc-TV, Ac-TVM-OEt, Ph-NHCO-TVM, Ph-NHCO-TVM-OEt. (15) tSXNAc-SMN, Ac-SNN, Ac-SSN, Ac-SMN-OEt, Ac-SNN-OEt, Ac-SSN-OEt, Ph-NHCO-SMN, Ph-NHCO-SNN, Ph-NHCO-SSN, Ph-NHCO-SMN-OEt, Ph-NHCO-SNN-OEt, Ph-NHCO-SSN-OEt. (16) tSXPAc-SSP, Ac-STP, Ac-TRP, Ac-SSP-OEt, Ac-STP-OEt, Ac-TRP-OEt, Ph-NHCO-SSP, Ph-NHCO-STP, Ph-NHCO-TRP, Ph-NHCO-SSP-OEt, Ph-NHCO-STP-OEt, Ph-NHCO-TRP-OEt. (17) tSXQAc-SDQ, Ac-SRQ, Ac-TAQ, Ac-SDQ-OEt, Ac-SRQ-OEt, Ac-TAQ-OEt, Ph-NHCO-SDQ, Ph-NHCO-SRQ, Ph-NHCO-TAQ, Ph-NHCO-SDQ-OEt, Ph-NHCO-SRQ-OEt, Ph-NHCO-TAQ-OEt. (18) tSXRAc-TAR, Ac-TDR, Ac-TAR-OEt, Ac-TDR-OEt, Ph-NHCO-TAR, Ph-NHCO-TDR, Ph-NHCO-TAR-OEt, Ph-NHCO-TDR-OEt. (19) tSXSa) N末アセチル, C末フリー体: Ac-SCS, Ac-SQS, Ac-SSS, Ac-TQS, Ac-TSS. b) N末アセチル, C末エステル体: Ac-SCS-OEt, Ac-SQS-OEt, Ac-SSS-OEt, Ac-TQS-OEt, Ac-TSS-OEt. c) N末フェニルアミノカルボニル, C末フリー体: Ph-NHCO-SCS, Ph-NHCO-SQS, Ph-NHCO-SSS, Ph-NHCO-TQS, Ph-NHCO-TSS. d) N末フェ

ニルアミノカルボニル、C末エステル：Ph-NHCO-SCS-OEt、Ph-NHCO-SQS-OEt、Ph-NHCO-SSS-OEt、Ph-NHCO-TQS-OEt、Ph-NHCO-TSS-OEt。(20) tSXTAc-TDT、Ac-TDT-OEt、Ph-NHCO-TDT、Ph-NHCO-TDT-OEt。(21) tSXWAc-TAW、Ac-TAW-OEt、Ph-NHCO-TAW、Ph-NHCO-TAW-OEt。(22) tSXYAc-SRY、Ac-TLY、Ac-SRY-OEt、Ac-TLY-OEt、Ph-NHCO-SRY、Ph-NHCO-TLY、Ph-NHCO-SRY-OEt、Ph-NHCO-TLY-OEt。好ましい本発明の化合物としては、Ac-SLV、Ac-SFV、Ac-SIV、Ac-SRV、Ac-SVV、Ac-TLV、Ac-SLL、Ac-TTL、Ac-SLV-OMe、Ac-SFV-OMe、Ac-SIV-OMe、Ac-SRV-OMe、Ac-SVV-OMe、Ac-TLV-OMe、Ac-SLL-OMe、Ac-TTL-OMe、Ac-SLV-OEt、Ac-SFV-OEt、Ac-SIV-OEt、Ac-SRV-OEt、Ac-SVV-OEt、Ac-TLV-OEt、Ac-SLL-OEt、Ac-TTL-OEt、Ph-NHCO-SLV、Ph-NHCO-SFV、Ph-NHCO-SIV、Ph-NHCO-SRV、Ph-NHCO-SVV、Ph-NHCO-TLV、Ph-NHCO-SLL、Ph-NHCO-TTL、Ph-NHCO-SLV-OMe、Ph-NHCO-SFV-OMe、Ph-NHCO-SIV-OMe、Ph-NHCO-SRV-OMe、Ph-NHCO-SVV-OMe、Ph-NHCO-TLV-OMe、Ph-NHCO-SLL-OMe、Ph-NHCO-TTL-OMe、Ph-NHCO-SLV-OEt、Ph-NHCO-SFV-OEt、Ph-NHCO-SIV-OEt、Ph-NHCO-SRV-OEt、Ph-NHCO-SVV-OEt、Ph-NHCO-TLV-OEt、Ph-NHCO-SLL-OEt、Ph-NHCO-TTL-OEt、Cyh-NHCO-SLV、Cyh-NHCO-SFV、Cyh-NHCO-SIV、Cyh-NHCO-SRV、Cyh-NHCO-SVV、Cyh-NHCO-TLV、Cyh-NHCO-SLL、Cyh-NHCO-TTL、Cyh-NHCO-SLV-OMe、Cyh-NHCO-SFV-OMe、Cyh-NHCO-SIV-OMe、Cyh-NHCO-SRV-OMe、Cyh-NHCO-SVV-OMe、Cyh-NHCO-TLV-OMe、Cyh-NHCO-SLL-OMe、Cyh-NHCO-TTL-OMe、Cyh-NHCO-SLV-OEt、Cyh-NHCO-SFV-OEt、Cyh-NHCO-SIV-OEt、Cyh-NHCO-SRV-OEt、Cyh-NHCO-SVV-OEt、Cyh-NHCO-TLV-OEt、Cyh-NHCO-SLL-OEt、Cyh-NHCO-TTL-OEt、Ph-CO-SLV、Ph-CO-SLV-OMe、Ph-CO-SLV-OEt、Cyh

$\text{—CO—SLV}$ 、 $\text{Cyh—CO—V—OMe}$ 、 $\text{Cyh—CO—SLV—OEt}$  があげられる。但し、上記化合物の略式表現において、 $\text{Ac—}$ 、 $\text{Ph—CO—}$ 、 $\text{Cyh—CO—}$ 、 $\text{Ph—NHCO—}$ 、および  $\text{Cyh—NHCO—}$  は N 末端の修飾基を表しており、それぞれアセチル基、フェニルカルボニル基、シクロヘキシルカルボニル基、フェニルアミノカルボニル基、およびシクロヘキシルアミノカルボニル基を意味する。また、 $\text{—OMe}$ 、 $\text{—OEt}$  および  $\text{—OiPr}$  はそれぞれ C 末端のカルボキシル基がメチルエステル化、エチルエステル化およびイソプロピルエステル化されていることを意味する。配列中の  $\text{—}\psi\text{—}(\text{CH}_2\text{NH})\text{—}$  はアミド結合のカルボニル基が還元されていることを意味しており、 $\text{—(NMe)X}$  はアミノ酸のアミノ基がメチル化されていることを意味する。尚、配列中の D アミノ酸については (D) X の記号で表している。

II. 本発明の化合物の合成法 本発明におけるペプチドは、以下に例示する著書において記載されている従来の固相合成法、液相法あるいは両者の組み合わせにより合成することができる：矢島治明（編）、「続医薬品の開発」、第 14 巻、廣川書店；軒原清史、有機合成化学協会誌、52 巻、347 ページ、1994 年；あるいは、Gregory A. Grant（編）、「Synthetic Peptides : A User's Guide」、W. H. Freeman and Company 社。固相上で合成されたペプチドは、最後の残基の脱保護の後、必要に応じて N 末端の修飾を行い、さらに固相（レジン）からの切り離しを行って得ることができる。ペプチド、および、それらの修飾体の純度ならびに構造確認は常法に従い、マススペクトル（イオンズプレー MS、FAB-MS、FD-MS）、HPLC、ならびに  $^1\text{H-NMR}$  (500MHz) スペクトルで行った。

N 末端の修飾体のうち、アセチル化は DMF（ジメチルホルムアミド）中、無水酢酸で処理することによって得られる。また、他のアシル化誘導体は、ペプチド合成と同様にカルボン酸化合物を N 末端アミノ基に縮合することによって得るか、あるいはアセチル化と同様に酸無水物法によって得ることができる。さらに、ウレイド型の修飾は、DMF 等の極性溶媒中、イソシアナート化合物と反応させることによって得ることができる。また、固相上で合成されたペプチドおよびそれらの誘導体は、固相から切り離した後、塩酸メタノールあるいはジアゾメタン処理によってメチルエステル体に変換することができる。他のエステル体については、塩化水素等の適当な酸触媒の存在下、アルコール化合物と縮合反応を行うことによって調製される。更にまた、本発明化合物のペプチド誘導体中、そのアミド結合の一個あるいは複数個が還元されたことを特徴とする化合物は、「J. Med. Chem.」, 28 巻, 1874 頁 (1985 年) あるいは「特開平 5-271273 号」公報記載の方法に従って液層法で調製することができる。すなわち、当該化合物は、文献記載の方法 (Org. Syn., 67 巻, 69 頁, 1988 年) で調製したアルデヒド体を用いて、アミンを還元的にアルキル化するか、あるいはアミド部分をボラン還元することによって得ることができ

る。本発明の化合物の薬学的に容認される塩は、例えばナトリウムおよびカリウムなどのアルカリ金属、カルシウムあるいはマグネシウムなどのアルカリ土類金属、あるいはジベンジルエチレンジアミン、トリエチルアミンおよびピペリジンのような有機の塩基、あるいは水酸化アンモニウムの適当量で、酸性残基を含む本発明の化合物を処理することによって調製される。また、塩基性残基を有する本発明の化合物は、硫酸、硝酸、塩酸、臭化水素酸、磷酸およびスルファミン酸などの無機酸、ならびに、蟻酸、酢酸、プロピオン酸、ピバリン酸、ジエチル酢酸、マロン酸、コハク酸、ピメリン酸、フマル酸、マレイン酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、クエン酸、グルコン酸、アスコルビン酸、ニコチン酸、イソニコチン酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸およびラウリル硫酸などの有機酸と反応せしめることによって、その薬学的に容認される塩に導くことができる。

III. 本発明の化合物の用途 本発明の化合物はレセプターのC末端の機能(RCR領域の機能)を調節する活性を有する。これらの化合物は、哺乳類のための、特にヒトのための医薬として有用である。本発明の化合物はレセプターの異常発現もしくはリガンドの異常発現により、レセプターからのシグナルが異常に伝達されることが原因となっている疾患、あるいは細胞内のレセプターのシグナルを伝達する因子の異常が原因となっている疾患のための医薬として有用である。たとえば、レセプターがFasである場合、対応する本発明の化合物を癌の治療における用途のために患者に投与することができる。この場合本発明の化合物で治療できる癌の種類は、結腸直腸癌、胃癌、肝癌、白血病、乳癌、卵巣癌を含むが、これらのものに限定されるものではない。レセプターがVIPレセプターである場合も、対応する本発明の化合物を癌の治療における用途のために患者に投与することができる。この場合本発明の化合物で治療できる癌の種類は、肺癌を含むが、これらのものに限定されるものではない。レセプターが $\beta_2$ -アドレナジックレセプターである場合、対応する本発明の化合物を緑内障の治療における用途のために患者に投与することができる。また、非選択的 $\beta$ -アドレナジックレセプター阻害剤の副作用の軽減における用途のために患者に投与することができる。レセプターがIL-8レセプターである場合、対応する本発明の化合物を慢性関節リウマチ、痛風、好中球性皮膚炎、喘息、潰瘍性大腸炎、敗血症、成人呼吸切迫症候群、などの炎症を伴う疾患の治療における用途のために患者に投与することができる。ただし、この場合対応する本発明の化合物で治療できる炎症の種類はこれらのものに限定されるものではない。Fas、VIPレセプターの他に癌に関連しているtSXXモチーフを有する細胞膜レセプターとして、transforming growth factor beta receptor III, insulin-like growth factor I receptor, growth hormone-releasing hormone receptor, somatostatin receptor 4, CTLA-4 counter-receptor B7-2, prolactin receptor long form, nerve growth factor receptor ho

molog, TGF-beta type II receptor, platelet-derived growth factor receptor beta, somatostatin receptor 1, somatostatin receptor SSTR3, folate receptor type gamma, parathyroid hormone related peptide receptor, fibroblast growth factor receptor 1, epidermal growth factor receptor HER4, nerve growth factor receptor. あるいは transforming protein mas をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、化学療法的利用が可能な抗腫瘍剤としての医薬組成物を提供し得る。免疫・アレルギーに関連している SXXモチーフを有する細胞膜レセプターとして、Fas, luteinizing hormone-choriogonadotropin receptor 1, T-cell surface glycoprotein CD2, CTLA-4 counter-receptor B7-2, interleukin-5 receptor, G protein-coupled receptor BLR, leukocyte surface glycoprotein CD16, vasoactive intestinal peptide receptor, antigen CD97, cell adhesion receptor CD36, IgG Fc receptor IIa, bradykinin B2 receptor あるいは histamine H2 receptor をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、免疫・アレルギー疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。造血系、血液凝固系に関連している tSXXモチーフを有する細胞膜レセプターとして、fibronectin receptor alpha chain, insulin-like growth factor I receptor, antigen CD97, cell adhesion receptor CD36, G-CSF receptor D7 あるいは u-plasminogen activator receptor form 2 をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、血液疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。IL-8 レセプターの他に炎症に関連している tSXXモチーフを有する細胞膜レセプターとして、transforming growth factor beta receptor III, prostaglandin E receptor subtype EP3C, prostanoid IP receptor, prostaglandin E receptor subtype EP1, G protein-coupled receptor BLR, nerve growth factor receptor homolog, TGF-beta type I receptor, cell surface glycoprotein CD11c, secretory phospholipase A2 receptor, bradykinin B2 receptor あるいは histamine H2 receptor をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、腎炎を含む炎症性疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。循環器系に関連している tSXXモチーフを有する細胞膜レセプターとして、transforming growth factor beta receptor III, natriuretic peptide receptor C, prostaglandin E receptor subtype EP3C, prostanoid IP receptor, cannabinoid receptor CB2, natriuretic peptide receptor A, adrenergic receptor alpha 1A, vasoactive intestinal peptide receptor, TGF-beta type I receptor, cell adhesion receptor CD36, nicotinic acetylcholine receptor beta-2 chain, platelet-derived growth factor receptor beta, beta-2-adrenergic

receptor, endothelin receptor, type, glucagon-like peptide-1 receptor, endothelin receptor B, antidiuretic hormone receptor, beta-1-adrenergic receptor, serotonin receptor 5HT-2, serotonin receptor 5HT-1C, serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor protein,あるいはalpha-2B-adrenergic receptorをあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、循環器系疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。脳・神経系に関連しているtSXXモチーフを有する細胞膜レセプターとして、glutamate receptor 6 kainate-preferring receptor, oxytocin receptor, insulin-like growth factor I receptor, protein-tyrosine kinase receptor, somatostatin receptor 4, somatostatin receptor 1, somatostatin receptor SSTR3, glutamate receptor GluR1, metabotropic glutamate receptor 5 B, metabotropic glutamate 5 A, G protein-coupled receptor GPR1, muscarinic acetylcholine receptor M3, thyrotropin-releasing hormone receptor, nerve growth factor receptor low affinity, VIP receptor, serotonin receptor 5HT-2, serotonin receptor 5HT-1C, NMDA receptor chain 1, NMDA receptor modulatory chain hNR2A, corticotropin-releasing hormone receptor,あるいはmelanocortin receptor 4をあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、脳・神経系疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。骨疾患に関連しているtSXXモチーフを有する細胞膜レセプターとして、calcitonin receptor, parathyroid hormone related peptide receptorあるいはinsulin-like growth factor I receptorをあげることができる。これらのレセプターに対応する本発明の化合物、およびそれらの薬学的に容認される塩は、骨疾患治療剤としての医薬組成物を提供し得る。本発明の化合物は、哺乳類、好ましくはヒトに対して、単独で、あるいは、好ましくは、標準的な医薬慣行に従い薬学的に容認できる担体もしくは希釈剤と、随意に、適当な補助剤と組み合わせて医薬組成物として投与することができる。この医薬組成物は、経口的に、あるいは、静脈中、筋肉内、皮下、肛門内、および局所投与など非経口的に投与することができる。本発明の化合物の経口的利用に関しては、選択した化合物（活性成分）を、例えば錠剤もしくはカプセルの形態として、あるいは、水溶液もしくは水性懸濁液として供与することができる。錠剤の場合には、通常使用されている担体、例えば乳糖、トウモロコシ澱粉などが用い得、かつ、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤も所望に応じて添加し得る。カプセル形態の場合には、有用な希釈剤として乳糖、乾燥トウモロコシ澱粉などが用い得る。水性懸濁液の場合には、活性成分を通常用いられている乳化用あるいは懸濁化用試薬と配合させればよい。いずれの場合とも所望に応じて特定の甘味用または香料用試薬を添加することができる。筋肉内、腹腔内、皮下および静脈内利用に関しては、活性成分の滅菌溶液を常法に応じて調製

する。活性成分を含む溶液はpHを適宜調節し、かつ緩衝化すべきである。特に、静脈内利用に関しては、溶質の総濃度を、最終調製物を等張にするように調節すべきである。本発明は、特に、薬学的に容認される担体もしくは希釈剤と共に、もしくはこれらを含むことなく、薬学的有効量の本発明の化合物を含む医薬組成物に関する。このような組成物としては、本発明の化合物と共に、例えば、pH 7.4の生理食塩水のような薬学的に容認される担体とを含む水溶液の形態のものも含む。この溶液を局所的な全量一括(bolus)注射により、患者の筋肉内の血流内へ導入することができる。本発明の化合物を活性成分としてヒト被験者内に投与する場合、1日の用量は、一般的には、年齢、体重、および、個々の患者の反応性、ならびに、患者の症状の重篤度により変化するため、最終的には担当の医師により決定される。具体的な例として、レセプターがFasの場合には対応する化合物を癌の治療を受けているヒトの患者に投与すると、1日当たり、約0.001mg/kg(ヒトの体重)から約20mg/kg程度、好ましくは、1日当たり、0.005mg/kgから約10mg/kg程度で用いられるのが一般的である。本発明の化合物を用いて後述のたとえば実施例39~44および84~85から明らかなように、細胞膜レセプターのC末端の機能を解析することができる。このとき、細胞膜レセプターが発現している細胞あるいは組織に該レセプターのリガンドもしくはそのアゴニストを併用して行うことができる。レセプターとしては細胞膜レセプター全てが対象となり得るが前述のtSXXモチーフを有するレセプターも含む。具体的にはレセプターがFasの場合、レセプターを有するがアポトーシスを起こさない癌細胞に有効量の抗Fas抗体あるいはFasリガンドと本発明の化合物、例えばPh-NHCO-SLV-OEtとを併用し、癌細胞にアポトーシスを誘導できればFasのRCR領域がシグナルの抑制に働いていたことが明らかとなる。また、レセプターがVIPレセプターである場合、有効量のVIPと本発明の化合物、例えばPh-NHCO-SLV-OEtとを併用し、VIPのシグナルが抑制されれば、VIPレセプターのRCR領域がシグナルの誘導に働いていたことが明らかとなる。他にレセプターとして $\beta_2$ -アドレナジックレセプターとIL-8レセプターの場合を例として示したが、いずれの場合とも本発明の化合物でレセプターのC末端領域がシグナル伝達に関与していること、さらにRCR領域がそのレセプターのシグナルに対して抑制的に働いているのか、誘導的に働いているのかが明らかとなった。このように、本発明の化合物は、細胞膜レセプターのC末端の機能を解析する方法において極めて有用であることがわかる。本発明は細胞膜レセプターのC末端とその結合蛋白との結合を阻害することにより細胞膜レセプターのシグナル伝達を調節する方法を含む。また、本発明は細胞膜レセプターのシグナル異常が原因である疾病、もしくはシグナル異常が直接的な原因でなくても細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療に有効である。例えば、既述のように

、レセプターが Fas である場合、Fas と P T P - B A S の結合を阻害することにより細胞死に関して Fas からのシグナルを正に調節することができる。よって、Fas からのシグナルをこのように調節する方法は癌の治療に適用できる。また、Fas シグナルの異常は自己免疫疾患の原因になることが証明されており (Nagata, S. and P. Golstein (1995), "The Fas death factor", Science (Wash. DC), 267: 1449-1456)、よって、上記の方法は免疫・アレルギー疾患の治療法となりうる。結合の阻害に関しては後述の実施例 31、38、39、40、84 に示すように、Fas の C 末端ペプチド S L V の誘導体を用いることができるが、これに限定されるものではない。また、レセプターが V I P レセプターである場合、実施例 41 および 44 から V I P レセプターの C 末端に結合するタンパクの存在が示唆されるが、該タンパクとの結合を阻害することにより、V I P の作用に関して V I P レセプターからのシグナルを負に調節することができる。V I P のアンタゴニストが非小細胞肺癌の増殖を抑制することから、V I P レセプターからのシグナルを負に調節する方法は肺癌の治療に適用できる。その際、結合の阻害には V I P レセプターの C 末端ペプチド S L V の誘導体を用いることができるが、これに限定されるものではない。また、V I P レセプターの発現は肺以外にも認められることから、シグナル伝達の調節による治療法の適用範囲は、肺癌に限定されるものではない。

$\beta_2$ -アドレナジックレセプターおよび I L - 8 レセプターについても、それぞれの C 末端配列の一部を有するペプチド誘導体はその配列依存的にそれぞれのシグナルを調節することから、それらに結合する蛋白の存在が考えられる。よって、レセプターが  $\beta_2$ -アドレナジックレセプターおよび I L - 8 レセプターの場合、これらと、未同定であるそれらの C 末端結合蛋白との結合を阻害することによりシグナルを調節することができ、このような調節方法がシグナル伝達の異常に起因する疾病の治療に有効であろうことは容易に推量できる。なお、本発明が対象とするレセプターは、細胞膜レセプター一般を指し、よって、上記の例にあげたレセプターに限定されるものではない。

実施例 本発明を以下の実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によって何等限定されるものではない。実施例 1 L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (S L V) の調製 Fmoc-L-バリンのついた Wang レジン (400mg, 0.2 ミリモル相当) を出発原料として、Fmoc 基 (フルオレニルメチルオキシカルボニル基) を脱保護した後、Fmoc-L-ロイシン (0.5 M 溶液) とのカップリング反応を固相上で行った。Fmoc 基の脱保護は 20% ピペリジン (DMF 溶液) を用い、カップリング反応は DIC (ジイソプロピルカルボジイミド) ならびに HBTU (O-ベンゾトリアゾール-N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロフォスフェート) を用いて行った。さらに、ロイシンの N 末端の Fmoc 基を同様に脱保護した後、Fmoc-O-tert-ブチル-



L-セリンとのカップリング反応( ) 様に行った。固相上合成されたペプチドは、N末端のFmoc基を脱保護した後、TFA(トリフルオロ酢酸)で処理することによって、セリン側鎖上の保護基(t-ブチル基)の脱離とレジンからの切り離しを行った。得られたペプチドは常法に従って精製し、32.1mgのL-セリル-L-ロイシル-L-バリン(SLV)を得た。FAB-MS(m/z): 318(MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR(δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95(12H, m), 1.66(3H, m), 2.16(1H, m), 3.85(1H, m), 3.94(2H, m), 4.27(1H, d, J=6.1Hz), 4.52(1H, dd, J=9.8, 4.9Hz)。

**実施例2 N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Ac-SLV)の調製** 実施例1と同様にWangレジン(90mg)を用い固相上で合成したペプチドのN末端に位置するFmoc基をピペリジンで脱保護した後、30%無水酢酸(DMF溶液)で処理することにより、N末端アミノ基のアセチル化を行った。TFA処理により、実施例1と同様に側鎖上の脱保護とレジンからの切り離しを行い、3.7mgのN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Ac-SLV)を得た。FAB-MS(m/z): 360(MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR(δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95(12H, m), 1.65(3H, m), 1.99(3H, s), 2.15(1H, m), 3.76(2H, m), 4.29(1H, d, J=6.1Hz), 4.44(1H, t, J=6.1Hz), 4.48(1H, dd, J=4.9, 10.4Hz)。

**実施例3 N-ベンゾイル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Ph-CO-SLV)の調製** 実施例1と同様にWangレジン(400mg)を用い固相上で合成したペプチドのN末端に位置するFmoc基をピペリジンで脱保護した後、安息香酸を用いて同様のカップリング反応を行い、さらにTFAで処理することにより、32.2mgのN-ベンゾイル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Ph-CO-SLV)を得た。FAB-MS(m/z): 422(MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR(δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95(12H, m), 1.65(2H, m), 1.75(1H, m), 2.16(1H, m), 3.90(2H, m), 4.29(1H, d, J=5.5Hz), 4.52(1H, dd, J=4.9, 9.8Hz), 4.68(1H, t, J=6.1Hz), 7.46(2H, m), 7.53(1H, m), 7.87(2H, d, J=7.3Hz)。

**実施例4 N-シクロヘキシルカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Cyh-CO-SLV)の調製** 実施例3の安息香酸の代わりにシクロヘキシルカルボン酸を用いて実施例3と同様にカップリング反応を行った後、TFA処理を行い、26.4mgのN-シクロヘキシルカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Cyh-CO-SLV)を得た。FAB-MS(m/z): 428(MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR(δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.94(12H, m), 1.28(3H, m), 1.41(2H, m),

1. 66 (4 H, m) 1. 78 (1 H, m), 2. 15 (1 H, m), 2. 24 (1 H, m), 3. 73 (2 H, m), 4. 29 (1 H, d, J=5.5 Hz), 4. 44 (2 H, m)。実施例5 N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ph-NHCO-SLV) の調製 実施例2と同様にWang レジン (400mg) を用い固相上で合成したペプチドを無水酢酸溶液の代わりに、フェニルイソシアナート (2MのDMF溶液) で処理した後、TFAで側鎖上の脱保護とレジンからの切り離しを行い、51.2mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ph-NHCO-SLV) を得た。FAB-MS (m/z): 437 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12 H, m), 1.69 (3 H, m), 2.17 (1 H, m), 3.74 (1 H, dd, J=10.4, 6.1 Hz), 3.86 (1 H, dd, J=10.4, 4.9 Hz), 4.29 (1 H, d, J=5.5 Hz), 4.40 (1 H, dd, J=6.1, 4.9 Hz), 4.50 (1 H, dd, J=9.8, 4.9 Hz), 6.97 (1 H, m), 7.24 (2 H, m), 7.35 (2 H, d, J=8.5 Hz)。実施例6 N-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Cyh-NHCO-SLV) の調製 実施例5のフェニルイソシアナートの代わりにシクロヘキシルイソシアナート (2MのDMF溶液) を用い、38.2mgのN-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Cyh-NHCO-SLV) を得た。FAB-MS (m/z): 443 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12 H, m), 1.17 (3 H, m), 1.34 (3 H, m), 1.60 (2 H, m), 1.71 (3 H, m), 1.85 (2 H, m), 2.16 (1 H, m), 3.47 (1 H, m), 3.66 (1 H, m), 3.78 (1 H, dd, J=10.4, 5.5 Hz), 4.29 (2 H, m), 4.48 (1 H, m)。実施例7 N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Ac-SLV-OMe) の調製 実施例2で得たN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-SLV) 14.9mgを適量のメタノールに溶解した後、ジアゾメタン (エーテル溶液) で処理することにより6.4mgのN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Ac-SLV-OMe) を得た。FD-MS (m/z): 373 (M<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>): 0.92 (12 H, m), 1.56 (1 H, m), 1.70 (2 H, m), 2.03 (3 H, s), 2.15 (1 H, m), 3.63 (2 H, m), 3.74 (3 H, s), 4.04 (1 H, br d, J=11.0 Hz), 4.41 (1 H, m), 4.54 (2 H, m), 6.48 (1 H, d, J=6.7 Hz), 6.69 (1 H, d, J=8.5 Hz), 6.77 (1 H, d, J=7.3 Hz)。実施例8 N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチ

ルエステル (Ph-NHCO-SLV-OMe) の調製

実施例5で得たN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ph-NHCO-SLV) 15.3mgを実施例7と同様にジアゾメタンで処理し、8.2mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Ph-NHCO-SLV-OMe) を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 451 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.90 (12H, m), 1.69 (3H, m), 2.14 (1H, m), 3.65 (1H, m), 3.72 (3H, s), 4.02 (1H, dd, J=7.3, 3.1 Hz), 4.54 (3H, m), 6.15 (1H, d, J=7.3 Hz), 7.04 (1H, t, J=7.3 Hz), 7.20 (2H, t, J=7.9 Hz), 7.30 (2H, overlapped)。

実施例9 N-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Cyh-NHCO-SLV-OMe) の調製

実施例6で得たN-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Cyh-NHCO-SLV) 15mgを実施例7と同様にジアゾメタンで処理し、4.8mgのN-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンメチルエステル (Cyh-NHCO-SLV-OMe) を得た。FD-MS ( $m/z$ ): 457 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (12H, m), 1.12 (3H, m), 1.34 (2H, m), 1.5-1.7 (6H), 1.90 (2H, m), 2.15 (1H, m), 3.51 (1H, m), 3.63 (1H, dd, J=11.0, 6.1 Hz), 3.73 (3H, s), 4.01 (1H, dd, J=11.0, 3.7 Hz), 4.44 (2H, m), 4.53 (1H, dd, J=8.9, 5.2 Hz), 5.55 (1H, br), 7.05 (1H, d, J=9.1 Hz)。

実施例10 N-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-L-セリル)アミノ-ペント-1-イル]-L-バリンメチルエステル (Ac-SL-ψ-(CH<sub>2</sub>NH)-V-OMe) の調製

N-アセチル-O-t-ブチル-L-セリン (210mg) と N-[4-メチル-2(S)-アミノ-ペント-1-イル]-L-バリンメチルエステル (340mg) をジオキサン (1.0ml) に溶解した後、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール・1水和物 (140mg) とジシクロヘキシルカルボジイミド (210mg) を添加し、反応液を室温で17時間攪拌した。不溶物を濾過で除去した後、シリカゲルクロマトグラフィーで精製し、181mgのN-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-O-t-ブチル-L-セリル)アミノ-ペント-1-イル]-L-バリンメチルエステルを主生成物として得た。さらに上記生成物181mgを95%TFA溶液で8時間処理した後、調製用薄層クロマトグラフィーで精製し、69mgのN-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-L-セリル)アミノ-ペント-1-イル]-L-バリンメチルエステル: (Ac-SL-ψ-(CH<sub>2</sub>NH)-V-O

Me)を得た。FD-MS ( $m/z$ ): 360 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.91 (1H, m), 1.28 (1H, m), 1.37 (1H, m), 1.61 (1H, m), 1.95 (1H, m), 2.02 (3H, s), 2.37 (1H, dd, J=11.6, 7.9 Hz), 2.67 (1H, dd, J=11.6, 4.3 Hz), 2.81 (1H, br), 3.01 (1H, d, J=5.5 Hz), 3.54 (1H, dd, J=11.6, 7.3 Hz), 3.72 (3H, s), 3.94 (1H, dd, J=11.6, 4.3 Hz), 4.10 (1H, m), 4.48 (1H, m), 6.50 (1H, d, J=9.2), 6.63 (1H, d, J=6.7 Hz)。実施例11 N-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-L-セリル)アミノ-ペント-1-イル]-L-バリン (Ac-SL-ψ-(CH<sub>2</sub>NH)-V) の調製 10mgのN-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-L-セリル)アミノ-ペント-1-イル]-L-バリンメチルエステルを1.0mLのメタノールに溶解した後、4等量の水酸化リチウム水溶液(0.5mL)を添加し、アルゴン雰囲気下、室温で12時間撹拌した。反応液を中和した後、イオン交換クロマトグラフィーによって目的とするN-[4-メチル-2(S)-(N-アセチル-L-セリル)アミノ-ペント-1-イル]-L-バリン (Ac-SL-ψ-(CH<sub>2</sub>NH)-V) を5.4mg得た。FD-MS ( $m/z$ ): 346 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.92 (3H, d, J=6.7 Hz), 0.95 (3H, d, J=6.7 Hz), 1.04 (3H, d, J=6.7 Hz), 1.10 (3H, d, J=6.7 Hz), 1.33 (1H, m), 1.54 (1H, m), 1.70 (1H, m), 2.01 (3H, s), 2.22 (1H, m), 2.95 (1H, br dd, J=12.8, 9.8 Hz), 3.20 (1H, br d, J=12.8 Hz), 3.38 (1H, br), 3.75 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz), 3.82 (1H, dd, J=10.4, 4.8 Hz), 4.27 (1H, m), 4.32 (1H, m)。実施例12 N-アセチル-D-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-(D)SLV) の調製 実施例1のFmoc-O-t-ブチル-L-セリンの代わりに、Fmoc-O-t-ブチル-D-セリンを用い、Wangレジン(400mg)上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって15.4mgのN-アセチル-D-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-(D)SLV) を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 360 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.62 (2H, m), 1.68 (1H, m), 2.00 (3H, s), 2.16 (1H, m), 3.76 (2H, m), 4.29 (1H, d, J=5.5 Hz), 4.40 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.47 (1H, dd, J=9.2, 5.5 Hz)。実施例13 N-アセチル-N-メチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-(NMe)SLV

) の調製 実施例 1 の Fmoc-L-セリンの代わりに、Fmoc-N-アセチル-L-ベンジル-L-セリンを用い、Wang レジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例 2 と同様に処理することによって 90.7mg の N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンを得た。このうち 26.9mg をエタノールに溶解し、水酸化パラジウムを触媒とし、水素雰囲気下 2.5 時間攪拌した。触媒を濾過によって除いた後、濾液を濃縮することによって目的とする N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-(NMe)SLV) を 0.68mg 得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 374 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.63 (3H, m), 2.15 (3H, s), 2.18 (1H, m), 2.65 (3H, s), 3.88 (1H, m), 3.97 (1H, m), 4.27 (1H, m), 4.45 (1H, m), 4.60 (1H, m)。

実施例 14 N-アセチル-L-セリル-L-グルタミル-L-バリン (Ac-SEV) の調製 実施例 1 の Fmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-グルタミン酸を用い、Wang レジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例 2 と同様に処理することによって 55.1mg の N-アセチル-L-セリル-L-グルタミル-L-バリン (Ac-SEV) を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 376 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.97 (6H, m), 1.93 (1H, m), 2.01 (3H, s), 2.16 (2H, m), 2.43 (2H, m), 3.74 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz), 3.80 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz), 4.29 (1H, d, J=5.5 Hz), 4.42 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.49 (1H, dd, J=8.1, 4.4 Hz)。

実施例 15 N-アセチル-L-セリル-L-リジル-L-バリン (Ac-SKV) の調製 実施例 1 の Fmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-リジンを用い、Wang レジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例 2 と同様に処理することによって 63.6mg の N-アセチル-L-セリル-L-リジル-L-バリン (Ac-SKV) を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 375 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.96 (6H, br d, J=6.7 Hz), 1.49 (2H, m), 1.68 (3H, m), 1.93 (1H, m), 2.00 (3H, s), 2.17 (1H, m), 2.92 (2H, br t, J=7 Hz), 3.77 (2H, m), 4.30 (1H, br d, J=6 Hz), 4.36 (1H, br t, J=7 Hz), 4.49 (1H, br dd, J=9.5 Hz)。

実施例 16 N-アセチル-L-セリル-L-フェニルアラニル-L-バリン (Ac-SFV) の調製 実施例 1 の Fmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-フェニルアラニンを用い、Wang レジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例 2 と同様に処理することによ

て43. 3mgのN-アセチル-L-セリル-L-フェニルアラニル-L-バリン (Ac-SIV) を得た。

FAB-MS ( $m/z$ ): 394 ( $MH^+$ )。  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.95 (6H, m), 1.96 (3H, m), 2.14 (1H, m), 2.93 (1H, m), 3.19 (1H, m), 3.68 (2H, d,  $J=6.1$  Hz), 4.28 (1H, m), 4.39 (1H, m), 4.71 (1H, m), 7.24 (5H, m)。 実施例17 N-アセチル-L-セリル-L-イソロイシル-L-バリン (Ac-SIV) の調製 実施例1のFmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-イソロイシンを用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって10.9mgのN-アセチル-L-セリル-L-イソロイシル-L-バリン (Ac-SIV) を得た。 FAB-MS ( $m/z$ ): 360 ( $MH^+$ )。

$^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.95 (12H, m), 1.19 (1H, m), 1.54 (1H, m), 1.89 (1H, m), 2.00 (3H, s), 2.15 (1H, m), 3.74 (2H, m), 4.29 (1H, d,  $J=6.1$  Hz), 4.34 (1H, d,  $J=7.3$  Hz), 4.47 (1H, m)。 実施例18 N-アセチル-L-セリル-L-バリル-L-バリン (Ac-SVV) の調製 実施例1のFmoc-L-ロイシンの代わりに、Fmoc-L-バリンを用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって39.0mgのN-アセチル-L-セリル-L-バリル-L-バリン (Ac-SVV) を得た。 FAB-MS ( $m/z$ ): 346 ( $MH^+$ )。  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.97 (12H, m), 2.01 (3H, s), 2.14 (2H, m), 3.74 (1H, dd,  $J=11.0, 6.1$  Hz), 3.76 (1H, dd,  $J=11.0, 5.5$  Hz), 4.30 (2H, m), 4.48 (1H, t,  $J=6.1$  Hz)。

実施例19 N-アセチル-L-スレオニル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-TLV) の調製 実施例1のFmoc-O-tert-ブチル-L-セリンの代わりに、Fmoc-O-tert-ブチル-L-スレオニンを用い、Wangレジン (400mg) 上でペプチドを合成した後、実施例2と同様に処理することによって14.8mgのN-アセチル-L-スレオニル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-TLV) を得た。

FAB-MS ( $m/z$ ): 374 ( $MH^+$ )。  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.92 (3H, d,  $J=6.7$  Hz), 0.96 (9H, m), 1.17 (3H, d,  $J=6.7$  Hz), 1.61 (2H, m), 1.71 (1H, m), 2.03 (3H, s), 2.16 (1H, m), 4.10 (1H, m), 4.28 (1H, d,  $J=5.5$  Hz), 4.35 (1H, d,  $J=4.9$  Hz), 4.52 (1H, dd,  $J=9.5, 5.8$  Hz)。実施例20 N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-イソロイシン (Ac-SLI) の調製 実施例1のFmoc-L-バリンのついたWangレジンの

代わりに、Fmoc-L-イソロイシンのついた Wang レジン (180 mg) を用いて固相上でペプチドを合成を行った後、実施例 2 と同様に処理することによって 3.6 mg の N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-イソロイシン (Ac-SLI) を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 374 ( $MH^+$ )。 $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.91 (12H, m), 1.21 (1H, m), 1.51 (1H, m), 1.62 (2H, m), 1.72 (1H, m), 1.87 (1H, m), 2.00 (3H, s), 3.75 (2H, m), 4.31 (1H, d,  $J=5.5$  Hz), 4.45 (2H, m)。

実施例 2.1 N-アセチル-L-アルギニル-L-アスパラギニル-L-グルタミル-L-イソロイシル-L-グルタミニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-RNEIQSLV) および N-アセチル-L-グルタミニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-QSLV) の調製 実施例 2 と同様に、N-アセチル-L-アルギニル-L-アスパラギニル-L-グルタミル-L-イソロイシル-L-グルタミニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-RNEIQSLV) および N-アセチル-L-グルタミニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (Ac-QSLV) を調製した。Ac-RNEIQSLV ionspray-MS ( $m/z$ ): 1000.1 ( $MH^+$ )。Ac-QSLV ionspray-MS ( $m/z$ ): 487.5 ( $MH^+$ )。 $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.96 (12H, m), 1.65 (5H, m), 1.99 (3H, s), 2.16 (1H, m), 2.31 (2H, m), 3.76 (1H, m), 3.83 (1H, m), 4.30 (2H, m), 4.42 (1H, m), 4.49 (1H, m)。

実施例 2.2 N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Ac-SLV-OEt) の調製 L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (1.82 g) と N-t-ブトキシ-O-ベンジル-L-セリン (2.09 g) を DMF (30 ml) に溶解し、ヒドロキシベンズトリアゾール・1水和物 (HOBt, 0.96 g) の存在下、N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・1塩酸塩 (EDC·HCl, 1.40 g) を縮合剤として 85 分間、室温で反応させた。反応液を酢酸エチルと水で振り分け、得られた有機層を飽和食塩水、飽和重曹水で洗浄し、芒硝で乾燥した後、減圧乾固した。乾燥生成物を TFA (6 ml) と水 (0.3 ml) の混合液に溶解し、室温で 40 分間反応させた後、減圧濃縮にて TFA を除去した。反応生成物を酢酸エチルと飽和重曹水で振り分け、有機層を飽和食塩水で洗浄し、芒硝で乾燥したのち濃縮し、O-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (3.08 g) を得た。次に、O-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (0.3 g) をジクロロメタン ( $CH_2Cl_2$ , 2 ml) に溶解し、無水酢酸 (80  $\mu$ l) とトリエチルアミン (120  $\mu$ l) を加え、室温で 18 時間反応させた。反応液に水を加えクロロホルムで抽出した。

後、抽出物を濃縮し、シリカゲルクロマトグラフィーにて精製を行い、N-アセチル-L-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (0.33 g) を得た。さらに、N-アセチル-L-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (0.33 g) をメタノール (10 ml) に溶解し、水酸化パラジウム炭素を触媒として、水素雰囲気下室温で15時間接触還元を行った。触媒を除去した後、濃縮乾固し、目的物であるN-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Ac-SLV-OEt) を215 mg 得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 388 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.88-0.96 (12H, m), 1.28 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.55-1.75 (3H, m), 2.03 (3H, s), 2.15 (1H, m), 3.61 (1H, m), 3.92 (1H, br), 4.00 (1H, m), 4.20 (2H, m), 4.47 (1H, m), 4.53 (1H, m), 4.59 (1H, m), 6.61 (1H, d, J=7.4 Hz), 6.86 (1H, d, J=8.6 Hz), 7.06 (1H, d, J=7.9 Hz)。実施例23 N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Ph-NHCO-SLV-OEt) の調製 実施例22で得られたL-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (0.5 g) をDMF (5 ml) に溶解し、フェニルイソシアナート (0.13 ml) を加えて室温で15時間反応させた。実施例22と同様に処理し、390 mg のN-フェニルアミノカルボニル-L-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステルを得た。次に、N-フェニルアミノカルボニル-L-ベンジル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (350 mg) をエタノール (10 ml) とDMF (10 ml) の混合溶媒に溶解し、実施例22と同様に接触還元を行い目的とするN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Ph-NHCO-SLV-OEt) を249 mg 得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 465 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>): 0.88-0.92 (12H, m), 1.28 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.57 (1H, m), 1.69 (2H, m), 2.15 (1H, m), 3.66 (1H, dd, J=11.0, 7.3 Hz), 3.91 (1H, dd, J=11.0, 4.9 Hz), 4.17 (2H, m), 4.48 (3H, m), 7.00 (1H, t, J=7.3 Hz), 7.24 (1H, dd, J=7.9, 7.3 Hz), 7.33 (1H, d, J=7.9 Hz)。実施例24 N-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリンエチルエステル (Cyh-NHCO-SLV-OEt) の調製 実施例23のフェニルイソシアナートの代わりにシクロヘキシルイソシアナートを用い、以下同様に処理することによって、目的とするN-シクロヘキシルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイ



シルーレーバリンエチルエステル (Serine Ethyl Ester) を 204 mg 得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 471 ( $MH^+$ )。 $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 0.90-0.96 (12H, m), 1.14 (3H, m), 1.28 (3H, t,  $J=7.3$  Hz), 1.34 (2H, m), 1.58 (2H, m), 1.69 (4H, m), 1.87 (2H, m), 2.15 (1H, m), 3.48 (1H, m), 3.60 (1H, dd,  $J=11.0, 6.7$  Hz), 3.83 (1H, dd,  $J=11.0, 4.9$  Hz), 4.18 (2H, m), 4.31 (1H, dd,  $J=6.5, 5.2$  Hz), 4.43 (2H, m)。実施例 25 N-アセチル

シルーレーバリンエチルエステル (Serine Ethyl Ester) の調製 L-ロイシルーレーアラニンエチルエステル (0.50 g) と N-Fmoc-L-セリン (0.83 g) を DMF (10 ml) に溶解し、ヒドロキシベンゾトリアゾール・1水和物 (HOBt, 0.30 g) の存在下、N-エチル-N'-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド・1塩酸塩 (EDC·HCl, 0.45 g) を縮合剤として 3.5 時間、室温で反応させた。反応液を酢酸エチルと水で振り分け、得られた有機層を飽和食塩水、飽和重曹水で洗浄し、芒硝で乾燥した後、減圧乾固した。乾燥生成物を 20% ピペリジン-DMF 溶液 (10 ml) に溶解し、室温で 50 分間反応させた後、酢酸エチルと飽和重曹水で振り分けた。有機層を飽和食塩水で洗浄し、芒硝で乾燥したのち濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製することにより、O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (0.59 g) を得た。次に、O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (163 mg) をジクロロメタン ( $CH_2Cl_2$ , 1 ml) に溶解し、無水酢酸 (45  $\mu$ l) とトリエチルアミン (75  $\mu$ l) を加え、室温で 8 時間反応させた。反応液に水を加えクロロホルムで抽出した後、抽出物を濃縮し、N-アセチル-O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (130 mg) を得た。さらに、N-アセチル-O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (130 mg) を TFA (2 ml) に溶解し、水 (0.1 ml) を加え室温で 45 分間撹拌した。酢酸エチルと水で振り分け、得られる有機層を飽和重曹水、飽和食塩水で洗浄後、芒硝で乾燥した。濃縮乾固して得られる固体をエーテル/ヘキサンで洗浄し、目的物である N-アセチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (Ac-SLA-OEt) を 25 mg 得た。

FAB-MS ( $m/z$ ): 360 ( $MH^+$ )。 $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CDCl_3$ ): 0.93 (3H, d,  $J=6.1$  Hz), 0.95 (3H, d,  $J=6.1$  Hz), 1.28 (3H, t,  $J=7.3$  Hz), 1.40 (3H, d,  $J=6.7$  Hz), 1.55-1.75 (3H, m), 2.04 (3H, s), 3.61 (1H, dd,  $J=11.0, 7.3$  Hz), 4.04 (1H, dd

, J=11.0, 4.3 Hz), 2.0 (2H, m), 4.43 (1H, m), 4.5 (2H, m), 6.55 (1H, d, J=7.3 Hz), 6.75 (1H, d, J=7.3 Hz), 6.81 (1H, d, J=7.9 Hz)。実施例26 N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (Ph-NHCO-SLA-OEt) の調製 実施例22で得られたO-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (0.4 g) をDMF (5 ml) に溶解し、フェニルイソシアナート (0.15 ml) を加えて室温で80分間反応させた。実施例23と同様に処理し、396 mgのN-フェニルアミノカルボニル-O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステルを得た。次に、N-フェニルアミノカルボニル-O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (390 mg) をTFA (5 ml) と水 (0.25 ml) の混合溶媒に溶解し、実施例25と同様に処理し目的とするN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (Ph-NHCO-SLA-OEt) を318 mg得た。FD-MS (m/z): 436 (M<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>): 0.89 (3H, d, J=5.5 Hz), 0.92 (3H, d, J=6.1 Hz), 1.22 (3H, t, J=7.0 Hz), 1.33 (3H, d, J=7.3 Hz), 1.5-1.75 (3H, m), 3.72 (1H, dd, J=11.0, 6.7 Hz), 3.97 (1H, dd, J=11.0, 4.3 Hz), 4.12 (2H, m), 4.49 (1H, m), 4.62 (1H, m), 4.81 (1H, m), 6.56 (1H, t, J=7.3 Hz), 6.98 (1H, t, J=7.3 Hz), 7.18 (2H, t, J=7.9 Hz), 7.25 (2H, overlapped), 7.61 (2H, br)。実施例27 N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニン (Ph-NHCO-SLA) の調製 実施例26で得られたN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニンエチルエステル (50 mg) をメタノール (1 ml) と水 (0.25 ml) の混合溶媒に溶解し、水酸化リチウム・1水和物 (20 mg) を加えて室温で4.5時間反応させた。反応液を酢酸エチルと1N-HClで振り分け、得られた有機層を食塩水で洗浄、芒硝で乾燥後、減圧濃縮し白色個体を得た。これをエーテルで洗浄することにより、目的とするN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-アラニン (Ph-NHCO-SLA) を33 mg得た。FD-MS (m/z): 409 (M<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CDCl<sub>3</sub>): 0.90-0.95 (6H, m), 1.22 (3H, t, J=7.0 Hz), 1.40 (3H, m), 1.55-1.75 (3H, m), 3.70 (1H, m), 3.92 (1H, m), 4.35-4.45 (3H, m), 4.62 (1H, m), 7.0 (1H, br t, J=7.3 Hz), 7.28 (2H, m), 7.36 (2H, b

r d, J=8.5 Hz)。実施例28 N-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-ロイシンエチルエステル: (Ph-NHCO-SLL-OEt) の調製 実施例5と同様に、Fmoc-L-ロイシンのついたWangレジン(600mg)から139.2mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-ロイシン(Ph-NHCO-SLL)を得た。次に、51.3mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-ロイシン(Ph-NHCO-SLL)を1.0mlの塩酸エタノール溶液に溶解し、室温で3.5時間攪拌した。反応液を中和後、水と酢酸エチルで振り分け、得られた有機層を芒硝で乾燥後、減圧濃縮した。シリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、20.6mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-ロイシンエチルエステル(Ph-NHCO-SLL-OEt)を得た。FD-MS (m/z): 479 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.93 (1H, t, J=7.3 Hz), 1.25 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.58-1.72 (6H, m), 3.72 (1H, d, J=10.4, 6.1 Hz), 3.86 (1H, d, J=10.4, 5.5 Hz), 4.14 (2H, m), 4.37 (1H, dd, J=6.1, 5.5 Hz), 4.40 (1H, dd, J=9.8, 5.5 Hz), 4.48 (1H, dd, J=10.4, 4.3 Hz), 6.97 (1H, t, J=7.3 Hz), 7.24 (2H, dd, J=8.5, 7.3 Hz), 7.36 (2H, d, J=8.5 Hz)。実施例29 N-フェニルアミノカルボニル-L-スレオニル-L-スレオニル-L-ロイシンエチルエステル: (Ph-NHCO-TTL-OEt) の調製 実施例28と同様に、Fmoc-L-ロイシンのついたWangレジン(600mg)から138.5mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-スレオニル-L-スレオニル-L-ロイシン(Ph-NHCO-TTL)を得た。次に、29.5mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-スレオニル-L-スレオニル-L-ロイシン(Ph-NHCO-TTL)を1.0mlの塩酸エタノール溶液に溶解し、0℃で2時間攪拌した。実施例28と同様に処理し、10.2mgのN-フェニルアミノカルボニル-L-スレオニル-L-スレオニル-L-ロイシンエチルエステル: (Ph-NHCO-TTL-OEt)を得た。FD-MS (m/z): 481 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.89 (6H, m), 1.25 (9H, m), 1.59-1.66 (3H, m), 4.15 (2H, m), 4.25 (2H, m), 4.30 (1H, d, J=3.7 Hz), 4.36 (1H, d, J=4.3 Hz), 4.43 (1H, m), 6.94 (1H, t, J=7.3 Hz), 7.24 (2H, dd, J=8.6, 7.3 Hz), 7.38 (2H, d, J=8.6 Hz)。参考例1 大腸癌におけるPTP-BASの発現 ヒト大腸癌細胞株HT-29 (ATCC HTB-38), WiDr (ATCC CCL-218), DLD-1 (AT

CC CCL-221), LS-180 (ATCC CCL-187), LS-174T (ATCC CCL-188), COLO205 (ATCC CCL-222), LoVo (ATCC CCL-229), SW480 (ATCC CCL-228) より Quick Prep<sup>TM</sup> Micro m RNA Purification Kit (ファルマシアバイオテック社) を用いて、それぞれの細胞の mRNA を調製した。つぎに、この mRNA より、SuperScript<sup>TM</sup> Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies 社) を用いた RT-PCR 法により cDNA を調製した。この cDNA を用いて PCR 法により PTP-BAS の発現を調べた。すなわち、12.5 ng/ $\mu$ l から 0.78 ng/ $\mu$ l に調製した cDNA 4  $\mu$ l を、PTP-BAS 特異的プライマー (5' primer: 5' -GAATACGAGTGTCAGACATGG-3', 3' primer: 5' -AGGTCTGCAGAGAAGCAAGAATAC-3') 10  $\mu$ M を含む PCR 反応液 (Recombinant Taq DNA Polymerase, TaKaRa Taq, 宝酒造社) 21  $\mu$ l に加え、35 サイクルで PCR を実施した。PCR 反応産物 25  $\mu$ l をエチジウムブロマイド (0.3  $\mu$ g/ml) を含むアガロースゲル (2%) 中で電気泳動し、紫外線照射下で写真撮影した。PTP-BAS プライマーによる 607 bp の PCR 反応産物が確認された細胞において、PTP-BAS が発現していると判定した。表に示すとおり、8 株中 5 株に PTP-BAS の発現が認められた。

第1表 大腸癌における PTP-BAS の発現

大腸癌細胞	PTP-BAS の発現
HT-29	+
WiDr	+
DLD-1	+
LS-180	+
LS-174T	-
COLO205	-
LoVo	+
SW480	-

実施例 30 インビトロでの Fas と PTP-BAS の結合阻害 Glutathione S-transferase と Fas との融合蛋白は、ベクター pGEX-2T (ファルマシア社) に Fas (Ito 他、1991 年、前述) のアミノ酸 191-335 をコードする遺伝子をつなぎ、大腸菌で発現させ調製した。固相化した GST-Fas 融合蛋白は、大腸菌で発現させた GST-Fas (アミノ酸 191-335) 融合蛋白を Glutath

Fused protein of Working Example 30 Fas with in-vitro and binding inhibition of PTP-BAS Glutathione S-transferase and Fas, it connected the gene which amino acid 191-335 of Fas (Ito other things, 1991 and earlier description) code is done to vector pGEX-2T (Pharmacia), revealed with E. coli and manufactured. With Glutathione Sepharose 4B (Pharmacia) incubation doing GST-Fas (amino acid 191-335) fused protein which is revealed with the E. coli it produced

ione Sepharose 4B (ファルマシア社)と共にインキュベーションして作製した。PTP-BASフラグメント1遺伝子は、PTP-BAS (Maekawa 他、前述)のFasとの結合領域を含む領域(アミノ酸1279-1883)をコードする遺伝子をBluescript pSK-II (Stratagene社)につないで作製した。[<sup>35</sup>S] PTP-BASフラグメント1は、PTP-BASフラグメント1遺伝子のTN T Reticulocyte Lysate System (Promega社)を用いたインビトロトランスレーションにより調製した。FasとPTP-BASの結合阻害実験は以下の方法で行った。反応溶液(50mM Tris-HCl (pH 8.0), 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0.1% NP-40, プロテアーゼインヒビターとして1mM PMSF, 50μg/ml Leupeptin, 1mM Benzamidin, 7μg/ml Pepstatin) 50μl中に固相化したGST-Fas (2~6μM) または固相化していないGST-Fas (2~6μM)、被検物質、および[<sup>35</sup>S] PTP-BASフラグメント1を混合し、4℃で12~16時間インキュベーションした。固相化したGST-Fasを用いた場合、反応後遠心操作によりGlutathione Sepharose 4Bを洗浄し、SDSサンプルバッファーに懸濁してSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。ゲルを乾燥後、オートラジオグラフをとり、GST-Fasに結合していた[<sup>35</sup>S] PTP-BASフラグメント1のバンドの濃淡より被検物質によるFasとPTP-BASの結合阻害を測定した。固相化していないGST-Fasを用いた場合は、インキュベーション後Glutathione Sepharose 4Bを加え、さらに4℃で1時間インキュベーションし、GST-Fas-[<sup>35</sup>S] PTP-BASフラグメント1複合体とGlutathione Sepharose 4Bとを結合させた。遠心操作によりGlutathione Sepharose 4Bを洗浄したあと液体シンチレーターを加え、液体シンチレーションカウンターで[<sup>35</sup>S] PTP-BASフラグメント1の放射活性を測定した。反応液中にGST-Fasを加えていないものをブランク値とし、測定値より差し引いた。コントロール(被検物質非存在下)の放射活性に対する被検物質存在下での放射活性を求め、結合阻害曲線を描き、結

GST-Fas fused protein which immobilization is done. Connecting gene which is on (amino acid 1279 - 1883) which includes binding domain of the Fas of PTP-BAS (Maekawa other things, earlier description) code is done to Bluescript pSK-II (Stratagene corporation) it produced the PTP-BAS fragment 1 gene. It manufactured [ <sup>35</sup>S ] PTP-BAS fragment 1, with in-vitro translation which uses TNT Reticulocyte Lysate system ( Promega corporation) of PTP-BAS fragment 1 gene. It experimented Fas and PTP-BAS binding inhibition with method below. GST-Fas (2 to 6 M) or immobilization which immobilization is done it mixed GST-Fas (2 to 6 M), the detected substance, and [ <sup>35</sup>S ] PTP-BAS fragment 1 which have not been done in reaction solution (As 50 mM Tris - HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1 % NP - 40, protease inhibitor 1 mM PMSF, 50 g/ml Leupeptin, 1 mM Benzamidin, 7 g/ml Pepstatin) 50 l, 12 to 16 hours incubation did with 4 °C. When GST-Fas which immobilization is done is used, after reacting you washed Glutathione Sepharose 4B with centrifugation, suspension did in SDS sample buffer and did SDS polyacrylamide-gel electrophoresis. gel after drying, autoradiograph was taken, from light and shade of the band of [ <sup>35</sup>S ] PTP-BAS fragment 1 which has been connected to GST-Fas the binding inhibition of Fas and PTP-BAS was measured with detected substance. Case GST-Fas which immobilization has not been done is used, furthermore the 1 hour incubation it did with 4 °C including Glutathione Sepharose 4B after incubation, connected GST-Fas - [ <sup>35</sup>S ] PTP-BAS fragment 1 composite and Glutathione Sepharose 4B. radioactivity of [ <sup>35</sup>S ] PTP-BAS fragment 1 was measured with liquid scintillation counter after washing the Glutathione Sepharose 4B, with centrifugation including liquid scintillator. It designated those which do not add GST-Fas in reaction mixture as the blank value, deducted from measured value. radioactivity under detected substance existing for radioactivity of control (Under of detected substance absence) was sought, binding inhibition curve was drawn, concentration of detected substance which connection 50 % inhibition is done was designated as IC50.

合を50%阻害する被検物質の濃度をIC<sub>50</sub>とした。

第2表 インビトロでのFas と PTP-BASの結合阻害

被検物質	阻害活性 (IC <sub>50</sub> )
SLV	250 μM
Ac-RNEIQSLV	23 μM
Ac-QSLV	102 μM
Ac-SLV	47 μM
Ph-NHCO-SLV	9 μM
Cyh-NHCO-SLV	38 μM
Ph-NHCO-SLV-OMe	>1000 μM*
Cyh-NHCO-SLV-OMe	>1000 μM**
Ac-SEV	500 μM
Ac-TLV	62 μM

\* 1 mMで40%阻害, \*\* 1 mMで20%阻害

上記結果により、本発明のペプチド及びペプチド誘導体がインビトロでFasとPTP-BASの結合を阻害することが示された。実施例31 大腸癌株への細胞死の各種ペプチドによる誘導(その1) PTP-BASの発現が確認されているヒト大腸癌HT-29細胞およびDLD-1細胞を用いた。96穴平底プレート(Nunc社)を用いて、2×10<sup>4</sup>個のHT-29細胞もしくはDLD-1細胞を100 μlの培養液(10%FCSを含むRPMI 1640メディウム、日水製薬社)中で24時間、37℃、5%炭酸ガス条件下で培養し、各濃度の抗Fas抗体(CH-11, MBL社)もしくは培養液(コントロール)10 μl、および10 mMに調製したFasとPTP-BASとの結合阻害剤(Ph-NHCO-SLV-OMeのみ1 mM)もしくはその溶媒(コントロール)10 μlを添加してさらに20時間培養した。培養上清を除去後、付着した細胞をリン酸緩衝生理食塩水で数回洗浄し、上記培養液90 μlとMTT液(ケミコンインターナショナル社)10 μlを加え、4時間培養した。100 μlの0.04N HClを含むイソプロパノールを加えたのちに、マイクロプレートリーダーにより570 nmの吸光度を測定した。コントロール(CH-11非存在下で培養したとき)の吸光度に対するCH-11存在下で培養したときの吸光度を求め、百分率で表示した。

With above-mentioned result, peptide and peptide derivative of this invention being in-vitro, connection of Fas and PTP-BAS was shown isobstructed densely. human carcinoma of the colon HT-29 cell and DLD-1 cell where revelation of Working Example 31 With various peptide of cell death to carcinoma of the colon strain induction (1) PTP-BAS is verified were used. Making use of 96-hole flat bottom plate (Nunc corporation), 2 X 10<sup>4</sup> in culture fluid (RPMI 1640 medium which includes 10% FCS, Nissui Pharmaceutical Co. corporation) of 100 l it cultured HT-29 cell or DLD-1 cell under 24 hours, 37 °C and the 5% carbon dioxide gas condition, anti-Fas antibody of each concentration (CH-11, MBL corporation) or binding inhibitor of culture fluid (control) 10 l, and Fas and PTP-BAS which are manufactured in 10 mM (Only Ph-NHCO-SLV-OMe 1 mM) or it added solvent (control) 10 l and furthermore 20 hour cultured. culture supernatant after removing, several times you washed cell which deposits with phosphate buffered saline, 4 hours you cultured including the above-mentioned culture fluid 90 l and MTT liquid (Kemi Kong international corporation) 10 l. After adding isopropanol which includes 0.04N HCl of 100 l, the absorbance of 570 nm was measured due to microplate reader. When culturing under CH-11 existing for absorbance of control (It cultured under CH-11

第3表 FasとPTP-BASの結合阻害剤存在下での腫瘍細胞に対する抗Fas抗体の抗腫瘍作用

Fas/PTP-BAS 結合阻害剤	腫瘍	抗Fas抗体 CH-11 (ng/ml)							
		30	100	300	1000	阻害剤-	阻害剤+	阻害剤-	阻害剤+
Ac-SLV-OMe	HT-29	93	112	90	99	82	65	72	78
	HT-29	99	99	95	90	90	77	82	61
Cyh-NHCO-SLV	DLD-1	92	95	85	88	84	80	74	74
	HT-29	105	91	99	78	98	63	92	54
Cyh-NHCO-SLV-OMe	DLD-1	98	60	90	43	86	26	76	24
	HT-29	104	89	89	75	81	65	73	55
Ph-NHCO-SLV	DLD-1	100	91	102	88	85	86	78	75
	HT-29	97	100	94	92	86	83	72	64
Ph-NHCO-SLV-OMe*	DLD-1	95	93	88	94	81	80	75	63

\*本阻害剤のみ他の阻害剤の1/10濃度で実施した。

上記結果により、本発明のペプチド誘導体が抗Fas抗体に対する癌細胞の感受性を高め、癌細胞に細胞死を誘導することが示された。実施例32 15アミノ酸ペプチドによるFas/PTP-BAS結合阻害 実施例

With above-mentioned result, it raised sensitivity of cancer cell the peptide derivative of this invention for anti-Fas antibody, cell death it is induced was shown densely in cancer cell. Making use of method of Working Example 32 With 15 amino acid

30の方法を用い、FasのC末端15アミノ酸ペプチドによるFas/PTP-BAS結合阻害を求めた。ただし、空白値は、PTP-BASと結合しないことが知られているGST-Fas (アミノ酸191-320)を用いたときの値とした。陰性対照として、ヒトProadrenomedullin N-Terminal 20 Peptide (hPAMP) (配列: ARLDVASEFRKKWNKWLRSR-NH<sub>2</sub>)を用いた。図1にFasのC末端15アミノ酸ペプチドによるインビトロのFas/PTP-BAS結合阻害を示す。オートラジオグラフのバンドが薄くなるほど、阻害活性が高いことを示している。FasのC末端15アミノ酸ペプチド(Ac-DSENSNFRNEIQSLV)は、インビトロのFas/PTP-BAS結合を濃度依存的に阻害した。陰性対照のhPAMPは、1 mMにおいてもFas/PTP-BASの結合を全く阻害しなかった。実施例33 ペプチド鎖長とFas/PTP-BAS結合阻害活性の関係 実施例32の方法を用い、FasのC末端から1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 15個のアミノ酸残基からなる、N末端をアセチル化したペプチドのFas/PTP-BAS結合阻害活性を求めた。図2にFas/PTP-BASの結合におよぼす長さの異なるFasのC末端ペプチドの影響を示す。グラフに示すとおり、15~6個のアミノ酸鎖長ペプチドのFas/PTP-BAS結合阻害活性は同程度であった。5~3個のアミノ酸ペプチドは、10, 100 μMにおいて15~6個のアミノ酸ペプチドよりもFas/PTP-BAS結合阻害活性は弱かった。2個のアミノ酸、1個のアミノ酸ペプチドはFas/PTP-BAS結合をほとんど阻害しなかった。これらの結果から、Fas/PTP-BASの結合阻害には最短3個のアミノ酸ペプチド(Ac-SLV)が必要であると考えられた。実施例34 トリペプチドスキャンニングによるインビトロ結合阻害活性の変化 実施例32の方法に従い、Ac-SLVのそれぞれのアミノ酸を他のL-アミノ酸に置き換え、スキャンニングしたトリペプチドのインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を検討した。図3に1 mMのペプチド存在下、図4に0.1 mMペプチド存在下におけるFas/PTP-BAS結合阻害を示す。また、図5にAc-SLVとAc-TLVのFas/PTP-BAS結合阻害の濃度依存性曲線を示す。図3(左)に示すとおり、Sに対してスキャンニングした1 mMのペプチド存在下において、TはSと同程度の強い阻害活性を示した。図3(中央)に示すとおり、Lの位置は、1 mMペプチド存在下においてほとんど全てのアミノ酸と置換してもLと同程度の強い阻害活性を示した。図3(右)に示すとおり、Vの位置は、Iが強い阻害活性を持っていたが、その他のアミノ酸に置換したものは概してほとんど阻害活性を示さなかった。図4に示したように、Lをスキャンニングした0.1 mMペプチド存在下では、RがLと同程度の強さであった。図5に示したとおり、Fas/PTP-BAS結合阻害の濃度依存性曲線は、ほぼ同じ形状の曲線が描かれていることか

peptide Fas/PTP-BAS binding inhibition Working Example 30, Fas/PTP-BAS binding inhibition was sought with C-terminal 15 amino acid peptide of Fas. However, blank value, when with PTP-BAS it does not connect using the GST-Fas (amino acid 191-320) which is known densely, made value. As negative control, human Proadrenomedullin N-terminal 20 Peptide (hPAMP) (Arrangement: ARLDVASEFRKKWNKWLRSR-NH<sub>2</sub>) was used. In Figure 1 Fas/PTP-BAS binding inhibition of in-vitro is shown with C-terminal 15 amino acid peptide of the Fas. Extent and inhibitory activity where band of autoradiograph becomes thin are high, it has shown densely. C-terminal 15 amino acid peptide (Ac-DSENSNFRNEIQSLV) of Fas obstructed Fas/PTP-BAS connection of in-vitro in the concentration dependent. hPAMP of negative control did not obstruct connection of Fas/PTP-BAS completely regarding 1 mM. Making use of method of Working Example 33 peptide chain length and relationship of Fas/PTP-BAS binding inhibition Working Example 32, 1,2,3,4,5,6,7,8,15 it consists of amino acid residue from C-terminal of Fas, Fas/PTP-BAS binding inhibition of the peptide which N terminal acetylation is done was sought. Influence of C-terminal peptide of Fas where length which is caused to the connection of Fas/PTP-BAS in Figure 2 differs is shown. As shown in graph, Fas/PTP-BAS binding inhibition of amino acid chain length peptide of 15 to 6 was the same extent. As for amino acid peptide of 5 to 3, as for Fas/PTP-BAS binding inhibition it was weak in comparison with amino acid peptide of 15 to 6 in 10,100 μM. amino acid of 2, amino acid peptide of 1 did not obstruct Fas/PTP-BAS connection for most part. It was thought that from these results, amino acid peptide (Ac-SLV) of shortest 3 is necessary in binding inhibition of Fas/PTP-BAS. In accordance with method of Working Example 34 With tripeptide scanning change of in-vitro binding inhibitory activity Working Example 32, respective amino acid of Ac-SLV was replaced to other L-amino acid, in-vitro Fas/PTP-BAS binding inhibition of the tripeptide which scanning is done was examined. In Figure 3 under peptide existing of 1 mM, Fas/PTP-BAS binding inhibition in under 0.1 mM peptide existing in Figure 4 is shown. In addition, concentration dependency curve of Fas/PTP-BAS binding inhibition of Ac-SLV and Ac-TLV is shown in Figure 5. As shown in Figure 3 (左), T showed inhibitory activity where S and same extent are strong in under peptide existing of 1 mM which the scanning is done vis-a-vis S. As shown in Figure 3 (center), position of L all amino acid substituting for most part in under 1 mM peptide existing, showed inhibitory activity where the L and same extent are strong. As shown in Figure 3 (右), position of V had inhibitory activity where the I is strong, but those which are substituted in other amino acid did not show inhibitory activity generally for most part. As shown in Figure 4, under 0.1 mM peptide existing which L scanning is done, R was strength of L and same extent. As shown in Figure 5, as for concentration



ら、Ac-SLVとAc-TLVとはFas/PTP-BASの結合を同程度に阻害する事がわかった。これら図3、4及び5の結果より、Ac-SLVのSの位置はSまたはTが、Lの位置はL-アミノ酸あるいはグリシン、特にLまたはRが、Vの位置はVまたはIが、それぞれインビトロでのFas/PTP-BASの結合阻害に重要であることがわかった。実施例35 D体、Nメチル体、還元体のインビトロ結合阻害活性 実施例32の方法に従い、1mMのAc-SLVのD体、Nメチル体、還元体のインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を検討した。図6にD体、Nメチル体、還元体のインビトロ結合阻害活性を示す。これらの実験は、1mMのペプチド存在下で行った。Ac-SLVのSを(D)Sに置換しても、弱くはなるものの阻害活性は保持していた。Nメチル体、還元体も、Ac-SLVよりも阻害活性は弱くなるものの、活性は保持していた。実施例36 N末修飾によるインビトロ結合阻害活性の上昇 実施例32の方法に従い、Ac-SLVのN末端修飾体のインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を検討した。図7にN末修飾によるインビトロ結合阻害活性を示す。(N末端の修飾は、白丸がアセチル、黒三角がフェニルウレイド、白三角がシクロヘキシルウレイド、白四角が非修飾である)SLVのN末端修飾体はインビトロの結合阻害活性を上昇させた。その順番は、フェニルウレイド体>シクロヘキシルウレイド体>アセチル体であった。実施例37 インビトロ結合阻害活性へのC末修飾の影響 実施例32の方法に従い、C末端修飾体のインビトロFas/PTP-BAS結合阻害活性を検討した。結果を図8に示した。1mMのPh-NHCO-SLV-OMe, Cyh-NHCO-SLV-OMeは、Ac-SLVよりも活性は弱くなるものの、インビトロ結合阻害活性を保持していた。実施例38 Ac-SLVのマイクロインジェクションによる大腸癌株への細胞死の誘導 直径35mmのプラスチックシャーレ中にマイクログリッドカバースリップ(セロケイト、エッペンドルフ社)を固定し、このシャーレ中で2mlの培養液(10%FCSを含むRPMI1640メディウム、日水製薬社)を用いて $4 \times 10^5$ 個のヒト大腸癌細胞DLD-1を24時間、37℃、5%炭酸ガスの条件下で培養した。マイクログリッドカバースリップに接着した細胞に、マイクロマニピュレータ(エッペンドルフ社)、マイクロインジェクター(エッペンドルフ社)、およびガラス針(フェムトチップ、エッペンドルフ社)を用い、注入圧力50hPa、注入時間0.1秒の条件でK-PBS中で0.01mMに調製したAc-SLVもしくはコントロールとしてK-PBSのみをそれぞれ20から30個の細胞に注入した。なお、抗Fas抗体(CH-11)処理細胞では、マイクロインジェクション直前に100ng/mlのCH-11をシャーレに添加した。マイクロインジェクションの3時間後に写真撮影した。図9に示すとおり、癌細胞内に注入されたAc-SLVが抗Fas抗体に対する癌細胞の感受性を高め、癌細胞に細胞死を誘導することが示された

dependency curve of Fas/PTP-BAS binding inhibition, from fact that curve of almost same shape is drawn, Ac-SLV and the Ac-TLV obstructs connection of Fas/PTP-BAS understood densely in the same extent. From result of these Figure 3, 4 and 5, as for position of S of Ac-SLV the S or T, as for position of L L-amino acid or the glycine, especially L or R, as for position of V the V or I, are important in binding inhibition of Fas/PTP-BAS with the respective in-vitro, understood densely. In accordance with method of Working Example 35 in-vitro binding inhibitory activity of D isomer, N methyl compound and reduction product Working Example 32, D isomer of the Ac-SLV of 1 mM, in-vitro Fas/PTP-BAS binding inhibition of N methyl compound and reduction product was examined. in-vitro binding inhibitory activity of D isomer, N methyl compound and reduction product is shown in Figure 6. It did these experiments, under peptide existing of 1 mM. Substituting S of Ac-SLV in (D) S, you kept the inhibitory activity weakly. N methyl compound and reduction product, in comparison with Ac-SLV as for inhibitory activity weakly, you kept activity. In accordance with method of Working Example 36 With N terminal decoration rise of in-vitro binding inhibitory activity Working Example 32, in-vitro Fas/PTP-BAS binding inhibition of the N terminal decoration body of Ac-SLV was examined. In Figure 7 in-vitro binding inhibitory activity is shown with N terminal decoration. N terminal decoration body of (As for decoration of N terminal, white circle acetyl and black triangle the phenyl ureido and white triangle cyclohexyl ureido and white square are non-decoration.) SLV rose binding inhibition of in-vitro. sequence was phenyl ureido body > cyclohexyl ureido body > acetyl isomer. In accordance with method of Working Example 37 Influence of C terminal decoration to in-vitro binding inhibitory activity Working Example 32, in-vitro Fas/PTP-BAS binding inhibition of the C-terminal decoration body was examined. result was shown in Figure 8. As for Ph-NHCO-SLV-OMe, Cyh-NHCO-SLV-OMe of 1 mM, in comparison with Ac-SLV as for the activity weakly, in-vitro binding inhibitory activity was kept. micro grid cover slip (セロ K.jp7, Eppendorf corporation) was locked in plastic petri dish of Working Example 38 With microinjection of Ac-SLV induction of cell death to carcinoma of the colon strain diameter 35 mm, in this petri dish  $4 \times 10^5$  human carcinoma of the colon cell DLD-1 was cultured under condition of 24 hours, the 37 °C and 5 % carbon dioxide gas making use of culture fluid (RPMI1640 medium which includes 10 % FCS, Nissui Pharmaceutical Co. corporation) of 2 ml. In cell which it glues to micro grid cover slip, only K-PBS the respective 20 to 30 filled to cell as Ac-SLV or control which with condition of casting pressure 50 hPa and injection time 0.1 second in K-PBS are manufactured in 0.01 mM micro マニピュレータ (Eppendorf corporation), micro injector (Eppendorf corporation), and making use of glass needle (フェム jp7 chip, Eppendorf corporation).

。実施例3.9 大腸癌株への細胞死の各種ペプチドによる誘導(その2) 実施例3.1の方法に従ってヒト大腸癌DLD-1に対するFas/PTP-BAS結合阻害剤の細胞死誘導作用を調べた。ただし一部の試験では前培養時間を72時間とし、また、添加するFas/PTP-BAS結合阻害の濃度を2.5 mMから10 mMとした。マイクロプレートリーダーにより570 nmの吸光度を測定し、その値をもって生細胞数の指標とした。

図10に示すとおり、Cyh-NHCO-SLV-OMe、Cyh-NHCO-SLV-OEt、Ph-NHCO-SLV-OMe、Ph-NHCO-SLV-OEtが抗Fas抗体に対する癌細胞の感受性を高め、癌細胞に細胞死を誘導することが示された。実施例4.0 大腸癌株への細胞死の各種ペプチドによる誘導(その3)

実施例3.1の方法に従ってヒト大腸癌DLD-1に対するPh-NHCO-SLV-OEtの細胞死誘導作用を調べた。ただし前培養時間を72時間とした。また添加するPh-NHCO-SLV-OEtの濃度を2.5 mMとした。抗Fas抗体(CH-11)もしくは培養液およびPh-NHCO-SLV-OEtもしくはその溶媒を添加し、20時間後に、倒立顕微鏡下で写真撮影した。図11に示すとおり、Ph-NHCO-SLV-OEtはCH-11存在下で、DLD-1に顕著な細胞死(アポトーシス)を誘導した。実施例4.1 SLV誘導体によるVIP誘導気管支収縮の抑制(その1)

モルモット気管支標本の作製はAkasuの方法に準じて行った(Akasu, J. Pharma. Pharmacol. 4巻, 671ページ, 1952年)。モルモットの頸部および筋肉を正中線に沿って切開し、口喉頭蓋軟骨下端より胸部に至るまでの頸部気管を取り出して、Tyrode-Hepes栄養液中に浸した。十分に栄養液で濡らした紙をシャーレ内にしき、その上で外膜の疎性結合組織を取り除いた後、軟骨をつけたまま幅2~3 mmのリングとし、それぞれ3個、互いに連結した。筋の対側の軟骨をハサミで切り開き標本とし、37°C、CO<sub>2</sub> 5%、O<sub>2</sub> 95%の条件下のMagnus装置内につるした。VIPは累積法にて投与した。Ph-NHCO-SLV-OEtなどの薬剤は15分間前処置後その存在下でVIPを投与した。実験の間隔は5分間とし、その間Tyrode-Hepes液で2~3回洗浄を行った。図12に示すとおり、VIPは気管平滑筋を10<sup>-8</sup>Mより濃度依存的に弛緩させ3X10<sup>-6</sup>Mで最大反応を示した。ヒトVIPレセプターのC末端配列-S-L-Vを基に合成されたペプチド誘導体であるPh-NHCO-SLV-OEtはVIPによる気管平滑筋の弛緩反応を1X10<sup>-7</sup>M~1X10<sup>-4</sup>Mの範囲で濃度に依存して抑制し、1X10<sup>-5</sup>M以上で顕著な抑制効果を示した。一方、図13、14に示すとおり、C末端のVをAやLに置換したペプチド誘導体Ph-NHCO-SLA-OEt(図13)、Ph-NHCO-SLL-OEt(図14)は1X10<sup>-7</sup>M~1X10<sup>-6</sup>Mの濃度でVIPによる弛緩反応をわずかに抑制した。また、図15に示すとおり、細胞内に取り込ませる

Furthermore, with anti-Fas antibody (CH-11) treated cell, CH-11 of 100 ng/ml was added to petri dish immediately before microinjection. photographing it did after 3 hours of microinjection. As shown in Figure 9, it raised sensitivity of cancer cell Ac-SLV which was filled inside cancer cell for anti-Fas antibody, cell death it is induced was shown densely in cancer cell. Following to method of Working Example 39 With various peptide of cell death to carcinoma of the colon strain induction (2) Working Example 31, you inspected the cell death induction of Fas/PTP-BAS binding inhibitor for human carcinoma of the colon DLD-1. However with test of part preculture time was designated as 72 hours, in addition, concentration of Fas/PTP-BAS binding inhibition which is added was designated as the 10 mM from 2.5 mM. It measured absorbance of 570 nm due to microplate reader, it made indicator of living cell number with value. As shown in Figure 10, it raised sensitivity of cancer cell Cyh-NHCO-SLV-OMe, the Cyh-NHCO-SLV-OEt, Ph-NHCO-SLV-OMe and Ph-NHCO-SLV-OEt for anti-Fas antibody, cell death it is induced was shown densely in cancer cell. Following to method of Working Example 40 With various peptide of cell death to carcinoma of the colon strain induction (3) Working Example 31, you inspected the cell death induction of Ph-NHCO-SLV-OEt for human carcinoma of the colon DLD-1. However preculture time was designated as 72 hours. In addition concentration of Ph-NHCO-SLV-OEt which is added was designated as the 2.5 mM. It added anti-Fas antibody (CH-11) or culture fluid and Ph-NHCO-SLV-OEt or solvent, after 20 hour, photographing did under inversion microscope. As shown in Figure 11, Ph-NHCO-SLV-OEt under CH-11 existing, induced the marked cell death (apoptosis) in DLD-1. It produced Working Example 41 With SLV derivative control of VIP induction bronchoconstriction (1) Cavia (guinea pig) bronchium preparation according to method of Akasu (Akasu, J. Pharma. Pharmacol. Vol. 4, 671 page, 1952 year). incision it did neck part and muscle of Cavia (guinea pig) alongside the midline, from oral epiglottis cartilage bottom end until thoracic removing neck part tracheum, it soaked in Tyrode-Hepes nutrition liquid. System, after removing uninformed characteristic connective tissue of the outer membrane on that, while cartilage was attached it designated filter paper which in fully is soaked with nutrition liquid as ring of width 2 to 3 mm inside petri dish, respective 3, connected mutually. It cut open cartilage of anti-side of muscle with scissors and made the preparation, hung inside Magnus equipment under condition of 37°C, the CO<sub>2</sub> 5% and O<sub>2</sub> 95%. VIP prescribed with cumulative method. Ph-NHCO-SLV-OEt or other drug before 15 min after dealing with prescribed VIP under existing, interval of experiment made 5 min, washed 2 to thrice with Tyrode-Hepes liquid at that time. As shown in Figure 12, VIP tracheum smooth muscle from 10<sup>-8</sup>M relaxing in the concentration dependent, showed maximum reaction with 3X10<sup>-6</sup>. Ph-NHCO-SLV-OEt which is a peptide derivative which

ためのC末端の修飾を施していないペプチド誘導体  $\text{Ph-NHCO-SLV-OH}$  はVIPの弛緩反応を殆ど抑制しなかった。実施例42 SLL誘導体によるイソプロテレンール誘導気管支収縮の抑制 Isoproterenol (Iso) は $\beta_2$ -アドレナジックレセプターに作用して気管支の弛緩を誘導する。VIPの代わりにIsoを用い実施例41と同様の方法で化合物の弛緩抑制効果を測定した。図16に示すとおり、Isoは気管平滑筋を $10^{-8}\text{M}$ より濃度依存的に弛緩させ $3 \times 10^{-6}$ で最大反応を示した。ヒト $\beta_2$ -アドレナジックレセプターのC末端配列-S-L-Lを基に合成されたペプチド誘導体である $\text{Ph-NHCO-SLL-OEt}$ はIsoによる気管平滑筋の弛緩反応を $1 \times 10^{-7}\text{M} \sim 1 \times 10^{-4}\text{M}$ の範囲で濃度に依存して抑制し、 $1 \times 10^{-5}\text{M}$ 以上で顕著な抑制効果を示した。一方、図17、18に示すとおり、C末端のLをAやVに置換したペプチド誘導体 $\text{Ph-NHCO-SLA-OEt}$  (図17)、 $\text{Ph-NHCO-SLV-OEt}$  (図18)は $1 \times 10^{-7}\text{M} \sim 1 \times 10^{-4}\text{M}$ の濃度でVIPによる弛緩反応をわずかに抑制した。実施例43 TTL誘導体によるIL-8誘導細胞内Ca<sup>2+</sup>取り込みの抑制 IL-8レセプターの機能に対する本発明化合物の影響を調べるため、ヒトIL-8レセプターの遺伝子を高発現している細胞株を樹立した。具体的には、HEK293細胞にhIL-8B receptor (hIL-8BR) のcDNAをpEFneoを用いて導入し、hIL-8BRが安定高発現する細胞を得た。この細胞はhIL-8を適応すると細胞内Ca<sup>2+</sup>の大きな上昇が観察されたが、pEFneoのみを導入した細胞はhIL-8を添加しても細胞内Ca<sup>2+</sup>は極僅かな上昇がみられたのみであった。次に細胞をDMEM、10% FCS、1% ペニシリン-ストレptomycin (GIBCO-BRL 社製)、G418600  $\mu\text{g/ml}$ 中で260ml容のフラスコ中で培養し、ほぼconfluentになったところで実験に供した。培地を吸引した後5ml PBSで洗浄し、5  $\mu\text{M}$  Fura2-AM (HEPES buffer) にて30分インキュベーションした。PBS 5mlで洗浄し、トリプシン処理の後8.5mlのHEPES bufferを加えて遠心(1000 rpm  $\times$  3min)し、上清を除いた。得られた細胞に5mlの5  $\mu\text{M}$  Fura2-AM (HEPES buffer)を加え再びサスペンションしエッペンチューブ(1.5ml)に1mlずつ分注した。ここにHEPES bufferに溶解したサンプル化合物(1% DMSO)を添加(10  $\mu\text{l}$ )し、37°Cで更に30分インキュベーションした。その後遠心(1000 rpm  $\times$  3min)して上清を除きHEPES buffer 1mlを加え再びサスペンションした。ここに再びHEPES bufferに溶解したサンプル化合物(1% DMSO)を添加(10  $\mu\text{l}$ )し、5-10分室温に放置し、細胞内Ca<sup>2+</sup>の測定を行った。細胞内Ca<sup>2+</sup>の測定には日本分光社CAF-100を用いた。上記で調製した、細胞の浮遊液1mlを小型のスタラーバーを入れたキュベットに入れ、液を攪拌しながら37°Cに保温して測定を行った。380、34

is synthesized on basis of the C-terminal arrangement -S-L-V of human VIP receptor depending on concentration in range of  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  to  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ , controlled relaxing reaction of tracheum smooth muscle with VIP, showed the marked suppression effect with  $1 \times 10^{-5}\text{M}$  or more. As on one hand, shown in Figure 13, 14, V of C-terminal the peptide derivative  $\text{Ph-NHCO-SLA-OEt}$  (Figure 13) and  $\text{Ph-NHCO-SLL-OEt}$  (Figure 14) which are substituted in A and the L with concentration of  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  to  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  controlled relaxing reaction barely with the VIP. As shown in and Figure 15, peptide derivative  $\text{Ph-NHCO-SLV-OH}$  which does not administer decoration of C-terminal in order to make intracellular taken almost did not control relaxing reaction of VIP. Working Example 42 With SLL derivative control of isoproterenol induction bronchoconstriction Isoproterenol (Iso) operating 2-adding L-nadic receptor, induces there relaxation of bronchium. In place of VIP relaxation suppression effect of compound was measured with method which is similar to Working Example 41 making use of Iso. As shown in Figure 16, Iso tracheum smooth muscle from  $10^{-8}\text{M}$  relaxing in the concentration dependent, showed maximum reaction with  $3 \times 10^{-6}$ .  $\text{Ph-NHCO-SLL-OEt}$  which is a peptide derivative which is synthesized on basis of the C-terminal arrangement -S-L-L of human 2-adding L-nadic receptor depending on the concentration in range of  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  to  $1 \times 10^{-4}\text{M}$ , controlled relaxing reaction of tracheum smooth muscle with the Iso, showed marked suppression effect with  $1 \times 10^{-5}\text{M}$  or more. As on one hand, shown in Figure 17, 18, L of C-terminal the peptide derivative  $\text{Ph-NHCO-SLA-OEt}$  (Figure 17) and  $\text{Ph-NHCO-SLV-OEt}$  (Figure 18) which are substituted in A and the V with concentration of  $1 \times 10^{-7}\text{M}$  to  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  controlled relaxing reaction barely with the VIP. In order to inspect influence of the compound of this invention for function of the Working Example 43 With TTL derivative control of IL-8 induction intracellular Ca taking in IL-8 receptor, cell line which gene of human IL-8 receptor high has been revealed was established. Concretely, cDNA of hIL-8B receptor (hIL-8BR) was introduced in HEK293 cell making use of pEFneo, hIL-8BR stable high acquired cell which is revealed. As for this cell when it is adapted, rise where intracellular Ca<sup>2+</sup> is large was observed, but, cell which introduces only pEFneo was adding hIL-8, as for intracellular Ca<sup>2+</sup> polar little rise only could look at hIL-8. cell in DMEM, 10% FCS, 1% penicillin-streptomycin (GIBCO-BRL supplied), G418600  $\mu\text{g/ml}$  was cultured next in flask of 260 ml capacity, almost it was a place where it becomes confluent and it offered to experiment. After absorbing culture medium, you washed with 5 ml PBS, 30 min incubation did with 5  $\mu\text{M}$  Fura2-AM (HEPES buffer). You washed with PBS 5 ml, centrifugation (1000 rpm  $\times$  3 min) you did including HEPES buffer of the rear 8.5 ml of trypsin treatment, excluded supernatant. suspension it made again cell which is acquired including 5  $\mu\text{M}$  Fura2-AM (HEPES buffer) of 5 ml and at a time 1 ml aliquot

0 nmで励起したときの510 nm蛍光を測定し、340 nmで励起したときの値を、380 nmで励起したときの値で割ったものを相対的な $Ca^{2+}$ の変化とした。細胞浮遊液を装置にセットしてからベースの値が落ち着くのを待ってhIL-8（免疫生物研究所より購入）100 nMを10  $\mu$ l キュベットないにマイクロシリンジを用いて添加して1分程度観察した。観察終了後10% Triton X 100を10  $\mu$ l 添加し、そのときの値と更にその後3M EGTAを15  $\mu$ l 加えた時の値を用いて細胞内 $Ca^{2+}$ の絶対値を計算により求めた。得られた結果を次表に示す。

didin エツ pincher ゆ- $\delta$  (1.5 ml). Addition (10 1) it did sample compound (1% DMSO) which is melted in HEPES buffer here, furthermore 30 min incubation did with 37 °C. after that centrifugation (1000 rpm X 3 min) doing, excluding supernatant again the suspension it did including HEPES buffer 1 ml. Addition (10 1) it did sample compound (1% DMSO) which again is melted in HEPES buffer here, left in 5 - 10 min room temperature, measured intracellular  $Ca^{2+}$ . Jasco Corp. (DB 69-115-0700) corporation CAF - 100 was used to measurement of intracellular  $Ca^{2+}$ . It manufactured at description above, while inserting broth 1 ml of the cell in cuvette which inserted stirrer bar of miniature, agitating the liquid temperature-holding doing in 37 °C, it measured. When excitation doing with 380, 340 nm, 510 nm fluorescence was measured, when the excitation doing with 340 nm, when excitation doing value, with the 380 nm, those which are divided at value were made changing of the relative  $Ca^{2+}$ . After setting cell broth to equipment, waiting for fact that value of base settles, there is not a 10 1 cuvette making use of microsyringe adding, 1 min extent you observed hIL - 8 (From immunity organism research laboratory purchase) 100 nM. After observation ending 10% Triton X 100 10 1 was added, when value of that time furthermore after that 15 1 adding 3M EGTA, making use of value absolute value of intracellular  $Ca^{2+}$  was sought with calculation. result which is acquired is shown in next table.

第4表

化合物濃度* (M)	細胞内 $Ca^{2+}$ (nM)	阻害率 (%)
0	177	—
$10^{-8}$	155	12.4
$10^{-7}$	79	55.4

\*化合物はPh-NHCO-TTL-OEtを使用

ヒトIL-8BレセプターのC末端配列をもとにデザインされたPh-NHCO-TTL-OEtは、ヒトIL-8Bレセプター遺伝子トランスフェクタントのIL-8による細胞内 $Ca^{2+}$ 取込みを阻害した。実施例4.4  
SLV誘導体のVIP誘導気管支収縮の抑制（その2）  
2. モルモットの気管支の代わりにラット気管支を用い実施例4.1と同様の方法でVIP誘導気管支弛緩の化合

On basis of C-terminal arrangement of human IL - 8B receptor Ph - NHCO - TTL - OEt which the design is done obstructed intracellular  $Ca^{2+}$  taking in with IL - 8 of the human IL - 8B receptor gene transフェク Tang jp7. In place of bronchium of Working Example 44 Control of VIP induction bronchoconstriction of SLV derivative (2) Cavia (guinea pig) with method which is similar to Working Example 41 making

物による抑制効果を測定した。 $\text{Ph-NHCO-SLV-OEt}$ で15分間前処置後その存在下でVIPを投与した。実験の間隔は5分間とし、そのTyrode-Hepes液で2~3回洗浄を行った。結果を次表に示す。

use of rat bronchium spasm effect was measured with compound of VIP induction bronchium relaxation. With  $\text{Ph-NHCO-SLV-OEt}$  before 15 min after dealing with VIP was prescribed under existing interval of experiment made 5 min, washed 2 to thrice with Tyrode-Hepes liquid. result is shown in next table.

第5表

化合物濃度 (M)	弛緩 (%)
0	100
$10^{-6}$	62
$10^{-5}$	12
$10^{-4}$	14

VIPは $10^{-6}\text{M}$ の濃度でラット気管平滑筋を弛緩させた。ラットVIPレセプターのC末端配列-S-L-Vを基に合成されたペプチド誘導体である $\text{Ph-NHCO-SLV-OEt}$ はVIPによるラット気管平滑筋の弛緩反応を $1 \times 10^{-6}\text{M} \sim 1 \times 10^{-4}\text{M}$ の範囲で顕著に抑制した。実施例45 N-(2-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((2-NH<sub>2</sub>)Ph-NHCO-SLV)の調製 実施例23と同様に、O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-tert-ブチルエステルと2-ニトロフェニルイソシアネートを反応させN-(2-ニトロフェニル)アミノカルボニル-O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-tert-ブチルエステルを得た。これを、エタノール中、水酸化パラジウムの存在下接触還元し、N-(2-アミノフェニル)アミノカルボニル-O-tert-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-tert-ブチルエステルにした後、さらにTFAで処理することによって目的とするN-(2-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((2-NH<sub>2</sub>)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 452 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.93 (12H, m), 1.65 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.77 (1H, dd, J=11.0, 7.7 Hz), 3.86 (1H, dd, J=11.0, 7.5 Hz), 4.29 (1H, m), 4.37 (1H, m), 4.53 (1H, m), 7.15-7.3 (4H, m)。実施例46 N-(3-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-NH<sub>2</sub>)Ph-NHCO-SLV)の調製 実施例45の2-ニトロフェニルイソシアネートの代わりに、3-ニトロフェニルイソシアネートを用い、同様に処理することによって目的とするN-(3-アミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-NH<sub>2</sub>)Ph-NHCO-SLV)を得た。

ニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((3-NH<sub>2</sub>) Ph-NHCO-SLV) を得た。 FAB-MS (m/z): 452 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.65 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.74 (1H, dd, J=11.0, 6.1 Hz), 3.87 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz), 4.29 (1H, dd, J=6.1, 5.5 Hz), 4.40 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.52 (1H, m), 6.88 (1H, d, J=7.9 Hz), 7.14 (1H, d, J=8.5 Hz), 7.34 (1H, dd, J=7.9 Hz), 7.69 (1H, s)。 実施例 47 N-(4-アミノフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-NH<sub>2</sub>) Ph-NHCO-SLV) の調製 実施例 45 の 2-ニトロフェニルイソシアネートとの代わりに、4-ニトロフェニルイソシアネートを用い、同様に処理することによって目的とする N-(4-アミノフェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((4-NH<sub>2</sub>) Ph-NHCO-SLV) を得た。 FAB-MS (m/z): 452 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.65 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.74 (1H, dd, J=10.4, 6.1 Hz), 3.86 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz), 4.29 (1H, dd, J=6.1, 5.5 Hz), 4.38 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.52 (1H, m), 7.23 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.51 (2H, d, J=8.6 Hz)。 実施例 48 N-(2-(L-グルタミルアミノ)フェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (2-(Glu-NH) Ph-NHCO-SLV) の調製 実施例 45 で得られた N-(2-アミノフェニル) アミノカルボニル-O-t-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-O-t-ブチルエステルと N-Boc-L-グルタミン酸-γ-t-ブチルエステルを実施例 22 と同様に縮合した後、TFA で処理することにより目的とする N-(2-(L-グルタミルアミノ)フェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (2-(Glu-NH) Ph-NHCO-SLV) を得た。 FAB-MS (m/z): 581 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.93 (12H, m), 1.65 (3H, m), 2.15 (1H, m), 2.25 (2H, m), 2.57 (2H, m), 3.79 (1H, d, J=10.4, 6.1 Hz), 3.88 (1H, d, J=10.4, 5.5 Hz), 4.19 (1H, t, J=6 Hz), 4.27 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.38 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.50 (1H, dd, J=10.5 Hz), 7.22 (2H, m), 7.38 (1H, m), 7.61 (1H, m)。 実施例 49 N-(3-(L-グルタミルアミノ)フェニル) アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (3-(Glu-NH) Ph-NHCO-S



, J=11.0, 5.5 Hz), 3.88 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz), 3.25 (1H, t, J=6.1 Hz), 4.35 (2H, m), 4.53 (1H, dd, J=10.4, 4.9 Hz), 7.06 (1H, dd, J=6.7, 7.9 Hz), 7.21 (1H, dd, J=6.7, 7.3 Hz), 7.31 (1H, d, J=7.9 Hz), 7.79 (1H, d, J=7.3 Hz)。実施例52 N-(3-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(AcGlu-NH)Ph-NHCO-SLV)の調製 実施例49のN-Boc-L-グルタミン酸-γ-tert-ブチルエステルの代わりにN-Ac-L-グルタミン酸-γ-tert-ブチルエステルを用い、同様に処理することにより目的とするN-(3-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(AcGlu-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 623 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.0 (1H, m), 2.01 (3H, s), 2.15 (2H, m), 2.42 (2H, t, J=7.3 Hz), 3.73 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz), 3.85 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz), 4.28 (1H, m), 4.39 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.50 (2H, m), 7.18 (3H, m), 7.64 (1H, s)。実施例53 N-(4-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(4-(AcGlu-NH)Ph-NHCO-SLV)の調製 実施例50のN-Boc-L-グルタミン酸-γ-tert-ブチルエステルの代わりにN-Ac-L-グルタミン酸-γ-tert-ブチルエステルを用い、同様に処理することにより目的とするN-(4-(N-アセチル-L-グルタミルアミノ)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(4-(AcGlu-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 623 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.0 (1H, m), 2.01 (3H, s), 2.15 (2H, m), 2.42 (2H, t, J=7.3 Hz), 3.73 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz), 3.85 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz), 4.27 (1H, d, J=6.1 Hz), 4.37 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.47 (1H, dd, J=8.5, 5.5 Hz), 4.52 (1H, dd, J=9.8, 5.5 Hz), 7.32 (2H, d, J=9.2 Hz), 7.44 (2H, d, J=9.2 Hz)。実施例54 N-(4-メトキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-MeO)Ph-NHCO-SLV)の調製 実施例1と同様に固相上合成したペプチドを4-メトキシフェニルイソシアネートを



用い、実施例5と同様に処理し、目的とするN-(4-メトキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-MeO)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS(m/z): 467 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR(δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.72 (1H, dd, J=10.4, 6.1 Hz)、3.75 (3H, s)、3.84 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz)、4.28 (1H, d, J=5.5 Hz)、4.37 (1H, t, J=5.5 Hz)、4.51 (1H, dd, J=9.8, 4.9 Hz)、6.83 (2H, d, J=8.6 Hz)、7.24 (2H, d, J=8.6 Hz)。実施例5

5 N-ベンジルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Bn-NHCO-SLV)の調製 ベンジルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-ベンジルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(Bn-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS(m/z): 451 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR(δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.94 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.68 (1H, dd, J=10.4, 6.1 Hz)、3.80 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz)、4.28 (1H, d, J=5.5 Hz)、4.31 (2H, s)、4.34 (1H, t, J=5.5 Hz)、4.50 (1H, dd, J=10.4, 4.9 Hz)、7.21 (1H, m)、7.28 (4H, m)。実施例56

N-(4-アセチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-Ac)Ph-NHCO-SLV)の調製 4-アセチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(4-アセチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-Ac)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS(m/z): 479 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR(δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.16 (1H, m)、2.54 (3H, s)、3.74 (1H, dd, J=10.4, 6.1 Hz)、3.87 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz)、4.29 (1H, d, J=5.5 Hz)、4.40 (1H, t, J=5.5 Hz)、4.52 (1H, m)、7.51 (2H, d, J=8.6 Hz)、7.91 (2H, d, J=8.6 Hz)。実施例57

N-(4-フェノキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-PhO)Ph-NHCO-SLV)の調製 4-フェノキシフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(4-フェノキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-PhO)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS(m/z): 479 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR(δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.94 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.7

4 (1H, dd, J=10.4, 6.1 Hz), 3.86 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz), 4.26 (1H, d, J=5.5 Hz), 4.38 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.51 (1H, dd, J=10.4, 4.9 Hz), 6.92 (4H, m), 7.05 (1H, t, J=7.3 Hz), 7.31 (2H, t, J=8.5 Hz), 7.35 (2H, d, J=9.2 Hz)。実施例58 N-(5-エトキシカルボニルペンチル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (EtOCO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NHCO-SLV) の調製 4-アセチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(5-エトキシカルボニルペンチル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (EtOCO(CH<sub>2</sub>)<sub>5</sub>-NHCO-SLV) を得た。FAB-MS (m/z): 503 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.94 (12H, m), 1.24 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.35 (2H, m), 1.48 (2H, m), 1.55-1.75 (5H, m), 2.15 (1H, m), 2.31 (2H, t, J=7.3 Hz), 3.11 (2H, t, J=7.3 Hz), 3.66 (1H, dd, J=10.4, 6.1 Hz), 3.78 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz), 4.10 (2H, q), 4.30 (2H, m), 4.49 (1H, d, J=9.8, 4.9 Hz)。実施例59 N-ベンゾイルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (PhCO-NHCO-SLV) の調製 ベンゾイルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-ベンゾイルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (PhCO-NHCO-SLV) を得た。FAB-MS (m/z): 451 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.17 (1H, m), 3.80 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz), 3.92 (1H, dd, J=11.0, 4.9 Hz), 4.29 (1H, d, J=5.5 Hz), 4.52 (2H, m), 7.51 (2H, t, J=7.9 Hz), 7.62 (1H, t, J=7.3 Hz), 7.92 (2H, d, J=7.3 Hz)。実施例60 N-(3-ニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((3-NO<sub>2</sub>)Ph-NHCO-SLV) の調製 3-ニトロフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-ニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン ((3-NO<sub>2</sub>)Ph-NHCO-SLV) を得た。FAB-MS (m/z): 482 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.16 (1H, m), 3.76 (1H, dd, J=10.9, 5.5 Hz), 3.87 (1H, dd, J=10.9, 5.5 Hz), 4.29 (1H, d, J=5.5 Hz), 4.40 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.53 (1H, dd, J=9.8, 5.5 Hz)

、7. 47 (1H, t, J=7. 6 Hz)、7. 62 (1H, dd, J=7. 9, 1. 8 Hz)、7. 82 (1H, dd, J=7. 9, 1. 8 Hz)、8. 46 (1H, t, J=1. 8 Hz)。実施例61 N-(2-ニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((2-NO<sub>2</sub>)Ph-NHCO-SLV)の調製 2-ニトロフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(2-ニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((2-NO<sub>2</sub>)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 482 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0. 95 (12H, m)、1. 6-1. 8 (3H, m)、2. 15 (1H, m)、3. 79 (1H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz)、3. 84 (1H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz)、4. 28 (1H, d, J=5. 5 Hz)、4. 39 (1H, t, J=6. 1 Hz)、4. 52 (1H, dd, J=9. 8, 5. 5 Hz)、7. 14 (1H, dd, J=8. 5, 1. 2, 1. 2 Hz)、7. 60 (1H, ddd, J=8. 5, 1. 2, 1. 2 Hz)、8. 12 (1H, dd, J=8. 5, 1. 2 Hz)、8. 33 (1H, dd, J=8. 5, 1. 2 Hz)。実施例62 N-(4-ブロモフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-Br)Ph-NHCO-SLV)の調製 4-ブロモフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(4-ブロモフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-Br)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 515 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0. 94 (12H, m)、1. 6-1. 8 (3H, m)、2. 16 (1H, m)、3. 72 (1H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz)、3. 85 (1H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz)、4. 28 (1H, d, J=6. 1 Hz)、4. 37 (1H, t, J=5. 5 Hz)、4. 51 (1H, dd, J=9. 8, 4. 9 Hz)、7. 31 (2H, d, J=8. 5 Hz)、7. 36 (2H, d, J=8. 5 Hz)。実施例63 N-(4-エトキシカルボニルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-EtOCO)Ph-NHCO-SLV)の調製 4-エトキシカルボニルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(4-エトキシカルボニルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-EtOCO)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 509 (MH<sup>+</sup>)。<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0. 94 (12H, m)、1. 37 (3H, t, 6. 7 Hz)、1. 6-1. 75 (3H, m)、2. 15 (1H, m)、3. 75 (1H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz)、3. 86 (1H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz)、4. 30 (3H, m)、4. 39 (1H, m)、4. 52 (1H, m)、7. 48 (2H, d, J=8. 6 Hz)

)、7.90 (2H, d,  $J=8.0$  Hz)。実施例6  
4 N-(3-フルオロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-F)Ph-NHCO-SLV)の調製 3-フルオロフェニル  
 イソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行な  
 い、N-(3-フルオロフェニル)アミノカルボニル-L-セ  
 リル-L-ロイシル-L-バリン((3-F)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 455 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.72 (1H, dd,  $J=11.0, 6.1$  Hz)、3.86 (1H, dd,  $J=11.0, 5.5$  Hz)、4.27 (1H, br d,  $J=5.5$  Hz)、4.37 (1H, t,  $J=5.5$  Hz)、4.51 (1H, dd,  $J=9.8, 4.9$  Hz)、6.67 (1H, dd,  $J=7.9, 6.7$  Hz)、7.00 (1H, d,  $J=7.9$  Hz)、7.21 (1H, dd,  $J=11.6, 6.7$  Hz)、7.35 (1H, d,  $J=11.6$  Hz)。実施例65 N-(3-メトキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-MeO)Ph-NHCO-SLV)の調製 3-メトキシフェニルイ  
 ソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行な  
 い、N-(3-メトキシフェニル)アミノカルボニル-L-セ  
 リル-L-ロイシル-L-バリン((3-MeO)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 467 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.73 (1H, dd,  $J=10.4, 6.1$  Hz)、3.76 (3H, s)、3.85 (1H, dd,  $J=10.4, 5.5$  Hz)、4.28 (1H, br)、4.38 (1H, t,  $J=5.5$  Hz)、4.52 (1H, dd,  $J=9.8, 5.5$  Hz)、6.55 (1H, dd,  $J=7.9, 1.8$  Hz)、6.83 (1H, d,  $J=7.9$  Hz)、7.12 (2H, m)。実施例66 N-(3-メチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-Me)Ph-NHCO-SLV)の調製 3-メチルフェニルイソシアネートを用い、  
 実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-メチルフェ  
 ニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル  
 -L-バリン((3-Me)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 451 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR ( $\delta$ , CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m)、1.6-1.8 (3H, m)、2.15 (1H, m)、2.28 (3H, s)、3.70 (1H, dd,  $J=10.4, 6.1$  Hz)、3.85 (1H, dd,  $J=10.4, 5.5$  Hz)、4.28 (1H, br)、4.37 (1H, t,  $J=5.5$  Hz)、4.52 (1H, dd,  $J=9.7, 5.5$  Hz)、6.79 (1H, d,  $J=7.9$  Hz)、7.12 (2H, m)、7.12 (1H, s)。実施例67 N-(4-エチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル

N-((4-ethylphenyl)amino)carboxyl-L-serine-L-threonine-L-isoleucine-L-valine (4-ethylphenyl)amino carboxyl-L-serine-L-threonine-L-isoleucine-L-valine

の調製 4-エチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-((4-エチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン)を得た。FAB-MS (m/z): 465 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.19 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.6-1.8 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.72 (1H, dd, J=11.0, 6.1 Hz), 3.85 (1H, dd, J=11.0, 4.9 Hz), 4.27 (1H, br), 4.38 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.51 (1H, dd, J=9.8, 5.5 Hz), 7.08 (2H, d, J=8.5 Hz), 7.25 (2H, d, J=8.5 Hz)。実施例68

N-((2-isopropylphenyl)amino)carboxyl-L-serine-L-threonine-L-isoleucine-L-valine (2-isopropylphenyl)amino carboxyl-L-serine-L-threonine-L-isoleucine-L-valine の調製 2-イソプロピルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行い、N-((2-イソプロピルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン)を得た。FAB-MS (m/z): 479 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.22 (6H, d, J=6.7 Hz), 1.6-1.8 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.18 (1H, m), 3.72 (1H, dd, J=11.0, 6.1 Hz), 3.84 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz), 4.29 (1H, m), 4.39 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.53 (1H, m), 7.13 (2H, m), 7.29 (1H, m), 7.40 (1H, m)。実施例69

N-((2,5-dimethoxyphenyl)amino)carboxyl-L-serine-L-threonine-L-isoleucine-L-valine (2,5-dimethoxyphenyl)amino carboxyl-L-serine-L-threonine-L-isoleucine-L-valine の調製 2,5-ジメトキシフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-((2,5-ジメトキシフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン)を得た。FAB-MS (m/z): 519 (M+Na<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.93 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.16 (1H, m), 3.72 (3H, s), 3.75 (1H, m), 3.82 (3H, s), 3.85 (1H, m), 4.27 (1H, m), 4.38 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.51 (1H, dd, J=9.8, 4.9 Hz), 6.49 (1H, dd, J=9.2, 3.1 Hz), 6.84 (1H, d, J=9.2 Hz), 7.70 (1H, d, J=3.1 Hz)。実施例70

N-((3-cyanophenyl)amino)carboxyl-L-serine-L-threonine-L-isoleucine-L-valine (3-cyanophenyl)amino carboxyl-L-serine-L-threonine-L-isoleucine-L-valine の調製 3-シアノフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-((3-シアノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン)を得た。FAB-MS (m/z): 465 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.95 (12H, m), 1.19 (3H, t, J=7.3 Hz), 1.6-1.8 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.72 (1H, dd, J=11.0, 6.1 Hz), 3.85 (1H, dd, J=11.0, 4.9 Hz), 4.27 (1H, br), 4.38 (1H, t, J=5.5 Hz), 4.51 (1H, dd, J=9.8, 5.5 Hz), 7.08 (2H, d, J=8.5 Hz), 7.25 (2H, d, J=8.5 Hz)。実施例71

L-セリル-L-ロイシル-L-          ン((3-CN)  
 Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 484 ( $M+Na^+$ )。  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.16 (1H, m), 3.75 (1H, dd,  $J=11.0, 6.1$  Hz), 3.86 (1H, dd,  $J=11.0, 5.5$  Hz), 4.29 (1H, d,  $J=6.1$  Hz), 4.38 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 4.52 (1H, dd,  $J=9.8, 4.9$  Hz), 7.30 (1H, dd,  $J=9.2, 1.2$  Hz), 7.41 (1H, t,  $J=7.9$  Hz), 7.54 (1H, m), 7.90 (1H, m)。

実施例71  
N-(3-メトキシカルボニルアミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-MeOCONH)Ph-NHCO-SLV)の調製  
 3-メトキシカルボニルアミノフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-メトキシカルボニルアミノフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-MeOCONH)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 532 ( $M+Na^+$ )。  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.94 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.16 (1H, m), 3.72 (3H, s), 3.73 (1H, dd,  $J=10.4, 6.1$  Hz), 3.85 (1H, dd,  $J=10.4, 5.5$  Hz), 4.27 (1H, br), 4.38 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 4.49 (1H, dd,  $J=9.8, 4.9$  Hz), 7.08 (2H, m), 7.15 (1H, t,  $J=7.9$  Hz), 7.50 (1H, s)。

実施例72  
N-(3-トリフルオロメチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-CF3)Ph-NHCO-SLV)の調製  
 3-トリフルオロメチルフェニルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-(3-トリフルオロメチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-CF3)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 527 ( $M+Na^+$ )。  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.75 (1H, dd,  $J=10.4, 6.1$  Hz), 3.87 (1H, dd,  $J=10.4, 5.5$  Hz), 4.29 (1H, d,  $J=5.5$  Hz), 4.39 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 4.52 (1H, dd,  $J=9.8, 4.9$  Hz), 7.24 (1H, d,  $J=7.9$  Hz), 7.41 (1H, t,  $J=7.9$  Hz), 7.51 (1H, d,  $J=7.9$  Hz), 7.84 (1H, d,  $J=7.9$  Hz)。

実施例73  
N-1-ナフチルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(1-Nap-NHCO-SLV)の調製  
 1-ナフチルイソシアネートを用い、実施例54と同様に反応を行ない、N-1-ナフチルアミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(1-Nap-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS ( $m/z$ ): 527 ( $M+Na^+$ )。  $^1H$ -NMR ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.75 (1H, dd,  $J=10.4, 6.1$  Hz), 3.87 (1H, dd,  $J=10.4, 5.5$  Hz), 4.29 (1H, d,  $J=5.5$  Hz), 4.39 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 4.52 (1H, dd,  $J=9.8, 4.9$  Hz), 7.24 (1H, d,  $J=7.9$  Hz), 7.41 (1H, t,  $J=7.9$  Hz), 7.51 (1H, d,  $J=7.9$  Hz), 7.84 (1H, d,  $J=7.9$  Hz)。

V)を得た。 FAB-MS ( $m/z$ ): 509 ( $M+Na^+$ )。  $^1H-NMR$  ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.94 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.15 (1H, m), 3.78 (1H, dd,  $J=10.4$ , 6.1 Hz), 3.90 (1H, dd,  $J=10.4$ , 5.5 Hz), 4.28 (1H, br), 4.45 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 4.53 (1H, dd,  $J=9.8$ , 5.5 Hz), 7.43 (1H, dd,  $J=8.5$ , 7.3 Hz), 7.50 (2H, m), 7.66 (1H, d,  $J=8.5$  Hz), 7.72 (1H, d,  $J=7.3$  Hz), 7.86 (1H, d,  $J=7.3$  Hz), 8.05 (1H, d,  $J=7.7$  Hz)。 実施例 7.4

N-(3,5-ジニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3,5-(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Ph-NHCO-SLV)の調製

3,5-ジニトロフェニルイソシアネートを用い、実施例 5.4と同様に反応を行ない、N-(3,5-ジニトロフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3,5-(NO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>Ph-NHCO-SLV)を得た。 FAB-MS ( $m/z$ ): 549 ( $M+Na^+$ )。  $^1H-NMR$  ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.16 (1H, m), 3.78 (1H, dd,  $J=11.0$ , 6.1 Hz), 3.89 (1H, dd,  $J=11.0$ , 5.5 Hz), 4.29 (1H, m), 4.42 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 4.54 (1H, m), 8.54 (1H, t,  $J=1.8$  Hz), 8.68 (2H, d,  $J=1.8$  Hz)。 実施例 7.5

N-(3-アセチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-AcPh-NHCO-SLV)の調製

3-アセチルフェニルイソシアネートを用い、実施例 5.4と同様に反応を行ない、N-(3-アセチルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((3-AcPh-NHCO-SLV)を得た。 FAB-MS ( $m/z$ ): 501 ( $M+Na^+$ )。  $^1H-NMR$  ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ): 0.95 (12H, m), 1.6-1.8 (3H, m), 2.15 (1H, m), 2.58 (3H, s), 3.75 (1H, dd,  $J=10.4$ , 6.1 Hz), 3.87 (1H, dd,  $J=10.4$ , 5.5 Hz), 4.28 (1H, d,  $J=6.1$  Hz), 4.40 (1H, t,  $J=5.5$  Hz), 4.53 (1H, dd,  $J=9.8$ , 4.9 Hz), 7.38 (1H, t,  $J=7.9$  Hz), 7.60 (2H, overlapped), 8.03 (1H, s)。 実施例 7.6

N-(4-イソプロピルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(4-iPrPh-NHCO-SLV)の調製

4-イソプロピルフェニルイソシアネートを用い、実施例 5.4と同様に反応を行ない、N-(4-イソプロピルフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン((4-iPrPh-NHCO-SLV)を得た。 FAB-MS ( $m/z$ ): 501 ( $M+Na^+$ )。  $^1H-NMR$  ( $\delta$ ,  $CD_3OD$ ):

0. 95 (12 H, m), 1. 26 (6 H, d, J=6. 7 Hz), 1. 6-1. 8 (3 H, m), 2. 15 (1 H, m), 2. 84 (1 H, m), 3. 73 (1 H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz), 3. 85 (1 H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz), 4. 27 (1 H, d, J=6. 1 Hz), 4. 38 (1 H, t, J=5. 5 Hz), 4. 52 (1 H, dd, J=9. 7, 5. 5 Hz), 7. 11 (2 H, d, J=8. 5 Hz), 7. 26 (2 H, d, J=8. 5 Hz)。実施例 77 N-(3-(2-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Ph t-NH) Ph-NHCO-SLV)の調製 実施例 46 の中間体として得られる N-(3-アミノフェニル)アミノカルボニル-O-t-ブチル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン-t-ブチルエステルとフタル酸モノ-t-ブチルエステルとを実施例 22 と同様の方法により縮合した後、TFA で処理することにより、目的とする N-(3-(2-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Ph t-NH) Ph-NHCO-SLV)を得た。 FAB-MS (m/z): 600 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, DMSO-d<sub>6</sub>): 0. 88 (12 H, m), 1. 50 (2 H, m), 1. 64 (1 H, m), 2. 04 (1 H, m), 3. 49 (1 H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz), 3. 66 (1 H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz), 4. 09 (1 H, m), 4. 27 (1 H, m), 4. 40 (1 H, m), 6. 41 (1 H, d, J=7. 3 Hz), 7. 13 (1 H, t, J=7. 9 Hz), 7. 22 (1 H, t, J=8. 5 Hz), 7. 5-7. 7 (3 H, m), 7. 71 (1 H, s), 7. 86 (2 H, t, J=7. 0 Hz), 8. 09 (1 H, d, J=7. 9 Hz), 8. 84 (1 H, s), 10. 24 (1 H, s)。実施例 78 N-(3-フタルイミドフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-PhN)-Ph-NHCO-SLV)の調製 実施例 77 の反応は、N-(3-(2-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Ph t-NH) Ph-NHCO-SLV)以外に、N-(3-フタルイミドフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-PhN)-Ph-NHCO-SLV)を生成物として与えた。 FAB-MS (m/z): 582 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0. 94 (12 H, m), 1. 65-1. 75 (3 H, m), 2. 15 (1 H, m), 3. 73 (1 H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz), 3. 86 (1 H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz), 4. 27 (1 H, d, J=6. 1 Hz), 4. 38 (1 H, t, J=5. 5 Hz), 4. 51 (1 H, dd, J=9. 8, 5. 5 Hz), 7. 05 (1 H, dt, J=7. 3, 2. 0 Hz), 7. 40 (2 H, m), 7. 54 (1 H, t, J=2. 4 Hz), 7. 87 (1 H, dd, J=5. 5, 3. 1



Hz)、7.95 (1H, dd, 5.5, 3.1 Hz)。実施例79 N-(3-(3-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Iph t-NH)Ph-NHCO-SLV)の調製 実施例77のフタル酸モノメチルエステルの代わりにイソフタル酸モノメチルエステルを用い、同様に縮合した後、アルカリ加水分解、続いてTFA処理することによってN-(3-(3-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Iph t-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 600 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, DMSO-d<sub>6</sub>): 0.86 (12H, m)、1.52 (2H, m)、1.63 (1H, m)、2.03 (1H, m)、3.50 (1H, dd, J=10.4, 6.1 Hz)、3.66 (1H, dd, J=10.4, 5.5 Hz)、4.09 (1H, dd, J=8.5, 6.1 Hz)、4.28 (1H, m)、4.40 (1H, m)、6.43 (1H, d, J=8 Hz)、7.19 (2H, m)、7.32 (1H, d, J=7.9 Hz)、7.65 (1H, t, J=7.9 Hz)、7.84 (2H, overlapped)、8.11 (2H, overlapped)、8.17 (1H, d, J=7.9 Hz)、8.50 (1H, s)、8.85 (1H, s)、10.35 (1H, s)。実施例80 N-(3-(4-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Tph t-NH)Ph-NHCO-SLV)の調製 テレフタル酸モノメチルエステルを用い、実施例79と同様に反応を行いN-(3-(4-カルボキシベンズアミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(Tph t-NH)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 600 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.94 (12H, m)、1.55-1.70 (3H, m)、2.15 (1H, m)、3.74 (1H, dd, J=11.0, 6.1 Hz)、3.86 (1H, dd, J=11.0, 5.5 Hz)、4.29 (1H, m)、4.40 (1H, t, J=5.5 Hz)、4.53 (1H, m)、7.24 (2H, m)、7.33 (1H, m)、7.79 (1H, s)、7.99 (2H, d, J=7.9 Hz)、8.14 (2H, d, J=7.9 Hz)。実施例81 N-(3-(4-カルボキシブタナミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(HOCO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CONH)Ph-NHCO-SLV)の調製 グルタル酸モノエチルエステルを用い、実施例79と同様に反応を行いN-(3-(4-カルボキシブタナミド)フェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン(3-(HOCO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CONH)Ph-NHCO-SLV)を得た。FAB-MS (m/z): 566 (MH<sup>+</sup>)。 <sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0.94 (12H, m)、1.60-1.75 (3H, m)、1.96 (2H, m)、

2. 15 (1H, m)、2. 40 (1H, m)、3. 72 (1H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz)、3. 85 (1H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz)、4. 28 (1H, m)、4. 38 (1H, t, J=5. 5 Hz)、4. 50 (1H, dd, J=9. 7, 4. 9 Hz)、7. 17 (3H, m)、7. 61 (1H, s)。実施例 8 2

N-(3-テトラデカナミドフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (3-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CONH)Ph-NHCO-SLV) の調製 実施例 77 のフタル酸モノ-*t*-ブチルエステルの代わりに、ミリスチン酸を用いて同様の反応を行い N-(3-テトラデカナミドフェニル)アミノカルボニル-L-セリル-L-ロイシル-L-バリン (3-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-CONH)Ph-NHCO-SLV) FAB-MS (m/z): 662 (MH<sup>+</sup>)。

<sup>1</sup>H-NMR (δ, CD<sub>3</sub>OD): 0. 89 (3H, t, J=7. 3 Hz)、0. 95 (12H, m)、1. 25-1. 40 (20H, m)、1. 60-1. 75 (5H, m)、2. 15 (1H, m)、2. 34 (2H, t, J=7. 3 Hz)、3. 72 (1H, dd, J=10. 4, 6. 1 Hz)、3. 85 (1H, dd, J=10. 4, 5. 5 Hz)、4. 28 (1H, d, J=5. 5 Hz)、4. 39 (1H, t, J=5. 5 Hz)、4. 51 (1H, dd, J=9. 8, 4. 9 Hz)、7. 16 (3H, m)、7. 62 (1H, s)。実施例 8 3 インビトロでの Fas と PTP-BAS の結合阻害 実施例 32 の方法に従い、SLV の N 末端修飾体 (10 μM) のインビトロ Fas / PTP-BAS の結合阻害活性を測定した。第 6 表に N 末端修飾体によるインビトロ結合阻害活性

を示す。

第6表 インビトロでのFas と PTP-BASの結合阻害

<u>被検物質</u>	<u>阻害率 (%)</u>
実施例 4 5	4 8. 7
実施例 4 6	6 1. 1
実施例 4 7	5 5. 9
実施例 4 8	4 7. 8
実施例 4 9	7 6. 8
実施例 5 0	6 6. 6
実施例 5 1	5 5. 9
実施例 5 2	7 5. 6
実施例 5 3	6 0. 8
実施例 5 4	4 6. 8
実施例 5 5	3 0. 5
実施例 5 6	4 1. 1
実施例 5 7	3 9. 9
実施例 5 8	4 3. 4
実施例 5 9	2 5. 8
実施例 6 0	2 6. 9
実施例 6 1	4 9. 1
実施例 6 2	1 8. 6
実施例 6 3	3 0. 6
実施例 6 4	3 7. 6

実施例 6 5	3 2. 9
実施例 6 6	3 9. 3
実施例 6 7	4 8. 8
実施例 6 8	2 1. 7
実施例 6 9	2 3. 0
実施例 7 0	2 1. 9
実施例 7 1	4 9. 4
実施例 7 2	2 8. 7
実施例 7 3	2 8. 4
実施例 7 4	1 8. 3
実施例 7 5	3 0. 4
実施例 7 6	2 8. 1
実施例 7 7	6 3. 2
実施例 7 8	7 4. 7
実施例 7 9	6 8. 3
実施例 8 0	6 7. 2
実施例 8 1	6 7. 5
実施例 8 2	3 6. 0

Ph-NHCO-SLV 4 5. 9

実施例 8 4 Ac-SLVのマイクロインジェクションによる大腸癌株への細胞死の誘導 (その2) 直径 3 5 mmのプラスチックシャーレ中にマイクログリッドカバースリップ (セロケイト、エッペンドルフ社) を固定し、このシャーレ中で 2 ml の培養液 (10 % FCS を含む RPMI 1640 メディウム、日水製薬社) を用いて  $1 \times 10^5$  個のヒト大腸癌細胞 DLD-1 を 24 時間、37 °C、5 % 炭酸ガスの条件下で培養した。マイクログリッドカバースリップに接着した細胞に、マイクロマニピュレータ (エッペンドルフ社)、マイクロインジェクター (エッペンドルフ社)、およびガラス針 (フェムトチップ、エッペンドルフ社) を用い、注入圧力 5 0 h

Micro grid cover slip (セロ K.jp7, Eppendorf corporation) was locked in plastic petri dish of Working Example 84 With microinjection of Ac-SLV induction of cell death to carcinoma of the colon strain (2) diameter 35 mm, in this petri dish  $1 \times 10^5$  human carcinoma of the colon cell DLD-1 was cultured under condition of 24 hours, the 37 °C and 5 % carbon dioxide gas making use of culture fluid (RPMI1640 medium which includes 10 % FCS, Nissui Pharmaceutical Co. corporation) of 2 ml. In cell which it glues to micro grid cover slip, only K-PBS therespective 5 0 to 1 00 filled to cell as Ac-SLV, Ac-SLY or the control which in K-PBS which includes 0.1 % FITC-dextran with condition of the casting pressure 50

Pa、注入時間0.4秒の条件で1%FITC-デキストランを含むK-PBS中で100mMに調製したAc-SLV、Ac-SLYもしくはコントロールとしてK-PBSのみをそれぞれ50から100個の細胞に注入した。なお、抗Fas抗体(CH-11)処理細胞では、マイクロインジェクション直前に500ng/mlのCH-11をシャーレに添加した。マイクロインジェクションの16から20時間後に1%Hoechst 33342を含むPBSで核を染色し、写真撮影した。FITCで染色された細胞の内、位相差顕微鏡像およびHoechst 33342染色による核の形態変化によりアポトーシスを起こしている細胞を判定し、細胞数を数えた。第7表に示すとおり、癌細胞内に注入されたAc-SLVが抗Fas抗体に対する癌細胞の感受性を高め、癌細胞に細胞死を誘導することが示された。

hPa and injection time second micro manipulator (Eppendorf corporation), micro injector (Eppendorf corporation), and making use of glass needle (FemtoJet chip, Eppendorf corporation), are manufactured in 100 mM. Furthermore, with anti-Fas antibody (CH-11) treated cell, CH-11 of 500 ng/ml was added to petri dish immediately before microinjection. You dyed core with PBS which from 16 of microinjection includes 1% Hoechst 33342 after 20 hour, photographing did. Among cell which are dyed with FITC, cell where the apoptosis is to happen with shape change of core was decided with the phase contrast microscope image and Hoechst 33342 dyeing, cell count counted. As shown in Table 7, it raised sensitivity of cancer cell Ac-SLV which was filled inside cancer cell for anti-Fas antibody, cell death it is induced was shown densely in cancer cell.

第7表

アポトーシスを起こした細胞 (%)			
抗Fas抗体(CH-11)	Ac-SLV	Ac-SLY	K-PBSのみ
0 ng/ml	21.7	21.3	23.0
500 ng/ml	49.8	24.8	23.4

**実施例 8.5** IL-8で誘導される好中球遊走の抑制  
IL-8によるヒト好中球の遊走に対する本発明化合物(Ph-NHCO-TTL-OEt)の影響を、ケモタキシスチャンパーを用いて、下室へ移動してきた好中球をカウントすることで評価した。ケモタキシスチャンパーのフィルターはNeuro probe社製(ポアサイズ3μm)を用いた。好中球、IL-8、サンプルの希釈等には0.1%BSAを含むRPMI培地を用いた。下室に10<sup>-8</sup>MのIL-8を162μl加え、上室に好中球浮遊液100μl(10<sup>6</sup>個)を入れた。37℃で30分インキュベートし下室に移動した好中球をコーンターカウンターにてカウントした。サンプル無添加を100%としたときの遊走率(%)を求めた。得られた結果を次表に示す。

Was appraised by fact that count it does neutrophil which is moved to lower room influence of the compound of this invention (Ph-NHCO-TTL-OEt) for chemotaxis of the human neutrophil with Working Example 85. Is induced with IL-8 control of neutrophil chemotaxis which IL-8, making use of chemotaxis chamber. filter of chemotaxis chamber used Neuro probe supplied (pore size 3 μm). RPMI culture medium which includes 0.1% BSA was used to neutrophil, IL-8 and dilution etc of sample. IL-8 of 10<sup>-8</sup>M 162 μl was added to lower room, then neutrophil broth 100 μl (10<sup>6</sup>) was inserted in upper chamber. 30 min incubate it did with 37 °C and it counted neutrophil which was moved to lower room with Coulter counter. When designating sample no addition as 100%, chemotaxis ratio (%) was sought. result which is acquired is shown in next

table.

第8表

<u>化合物濃度* (M)</u>	<u>遊走 (%)</u>	<u>阻害率 (%)</u>
0	100	—
$10^{-7}$	113.7	0
$10^{-6}$	75.9	24.1
$10^{-5}$	26.1	73.9
$10^{-4}$	19.4	80.6

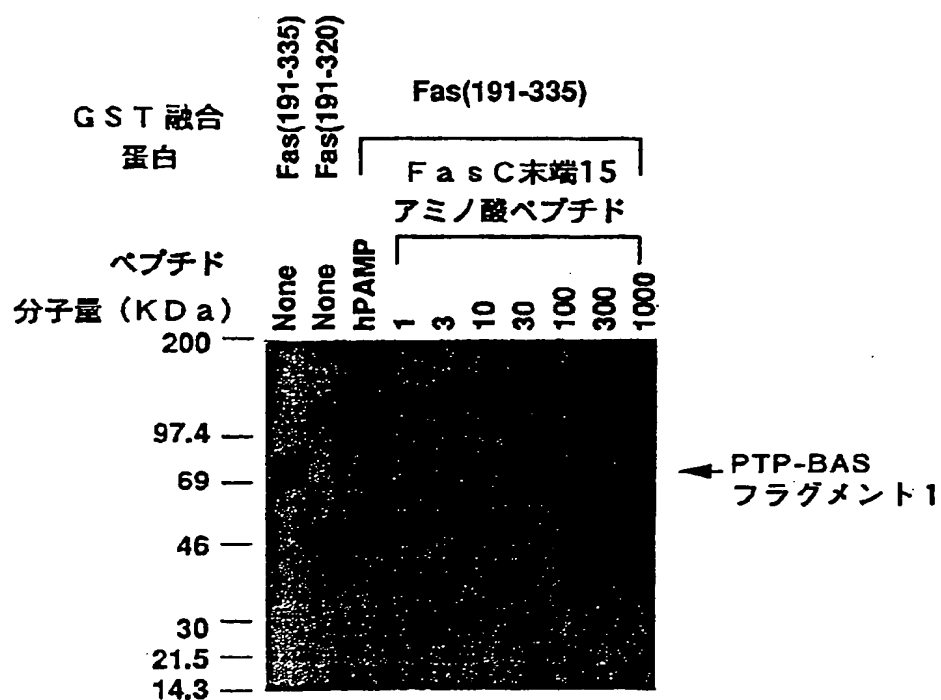
\*化合物はPh-NHCO-TTL-OEtを使用

産業上の利用可能性 本発明の化合物は、細胞膜レセプターの機能を調節する活性を有することから、細胞膜レセプターのシグナル伝達にかかわる疾病の治療剤に利用しうる。また、本発明の化合物は、細胞膜レセプターのC末端の機能を解析する方法および細胞膜レセプターのシグナル伝達を調節する方法においても利用しうる。

From fact that it possesses activity which adjusts function of cytoplasmic membrane receptor, it can utilize compound of utility this invention on industry, in the therapeutic agent of disease which relates to signal transduction of cytoplasmic membrane receptor. compound of and this invention can regarding to method which adjusts signal transduction of method and cytoplasmic membrane receptor which analyze the function of C-terminal of cytoplasmic membrane receptor, to utilize.

【図 1】

[Figure 1]



F I G . 1

【図 2】

[Figure 2]

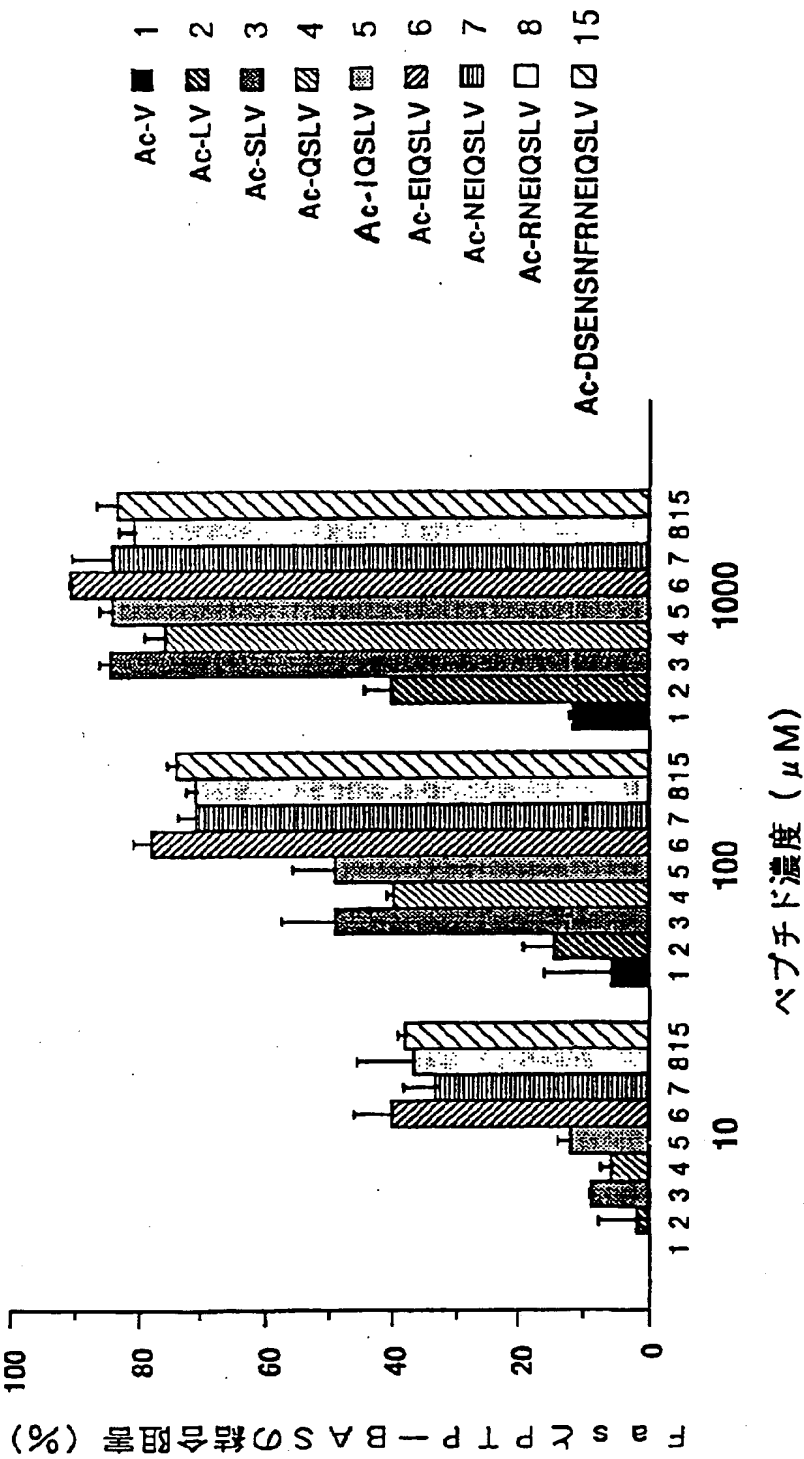


FIG. 2



【図 3】

[Figure 3]

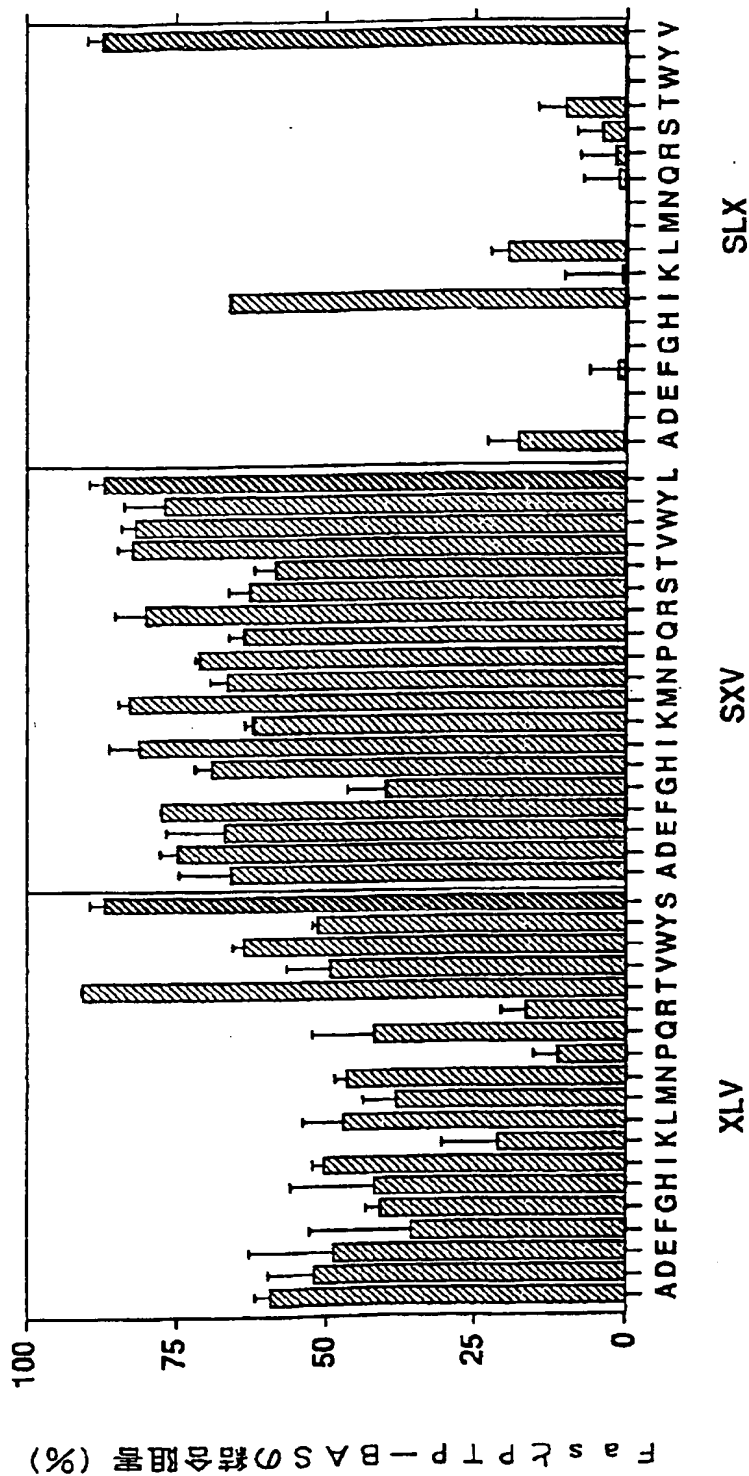


FIG. 3

【図 4】

[Figure 4]

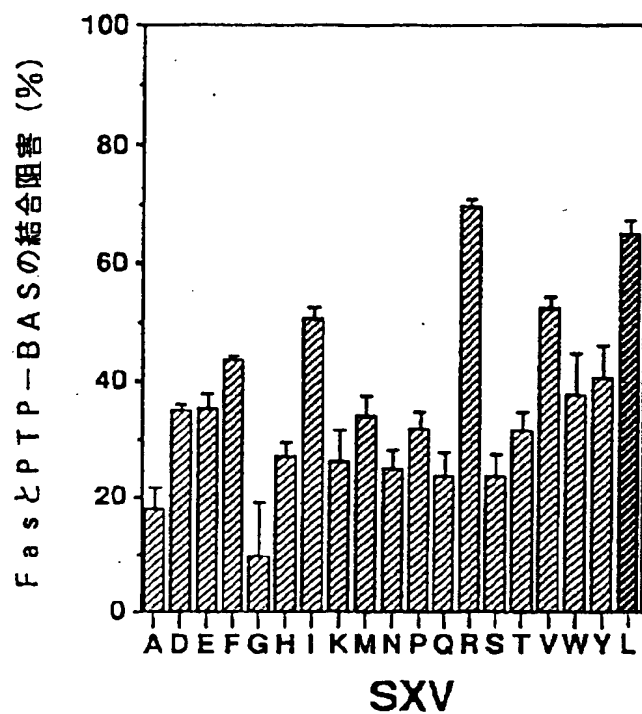


FIG. 4

【図5】

[Figure 5]

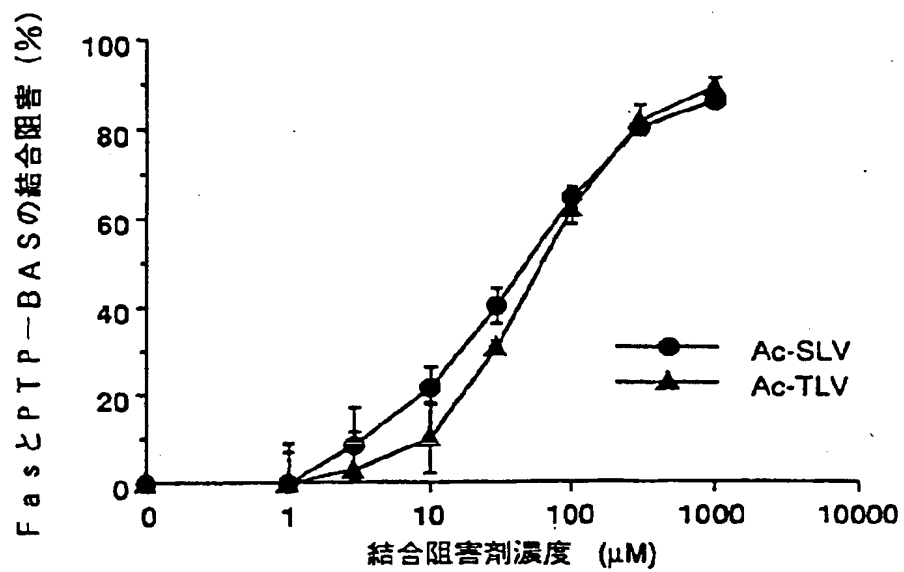


FIG. 5

【図 6】

[Figure 6]

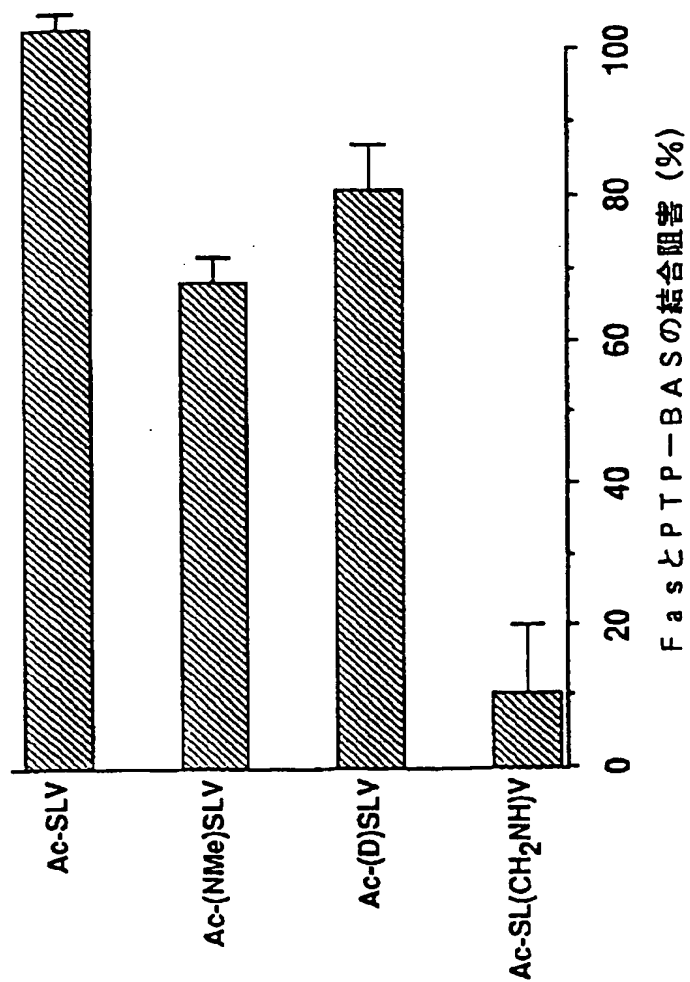


FIG. 6

【図 7】

[Figure 7]

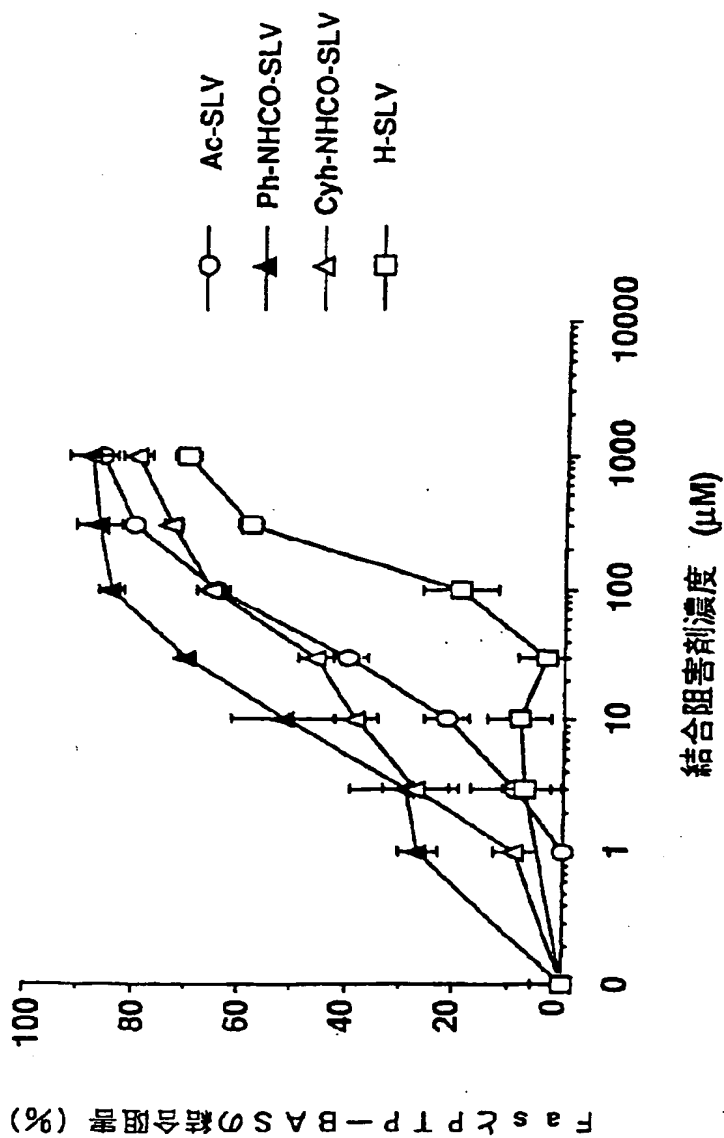


FIG. 7

【図8】

[Figure 8]

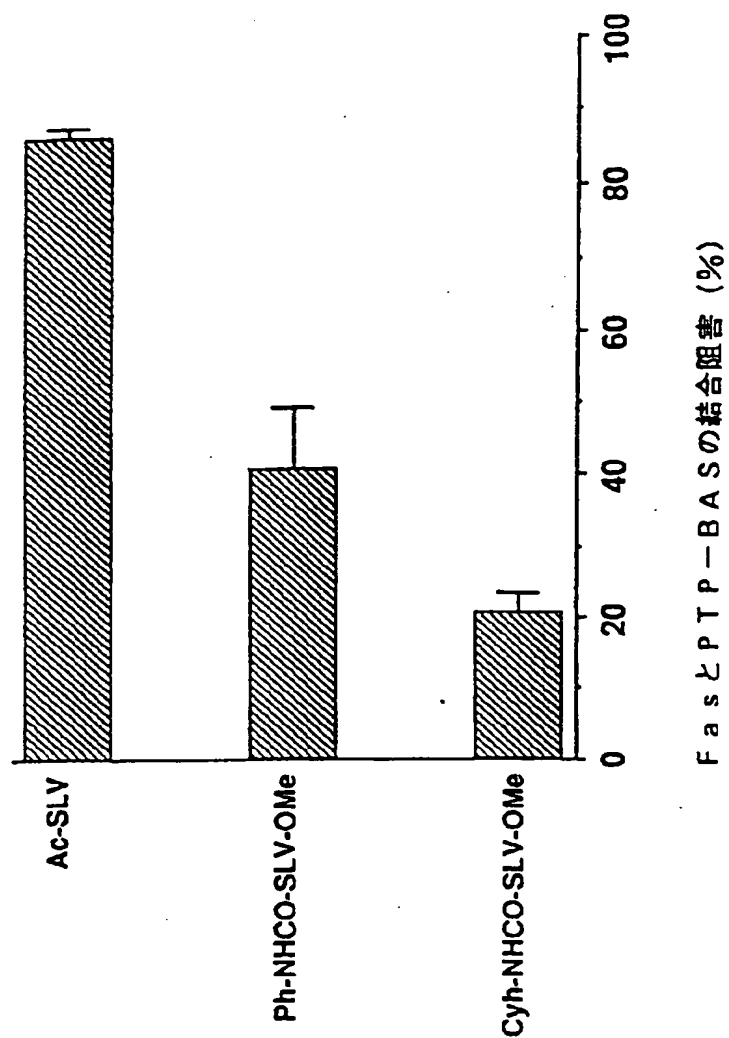


FIG. 8

【図9】

[Figure 9]

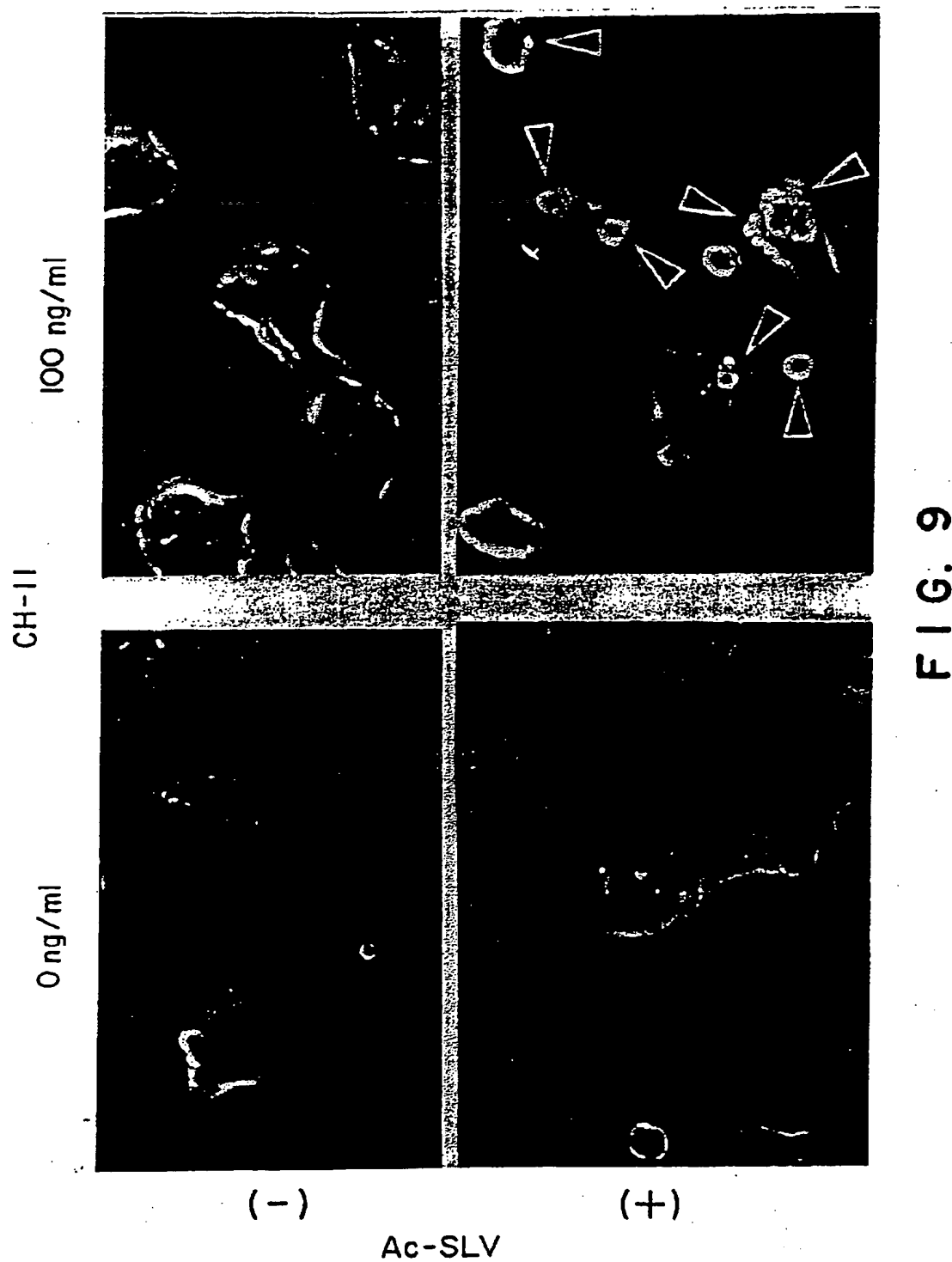


FIG. 9

【図 10】

[Figure 10]

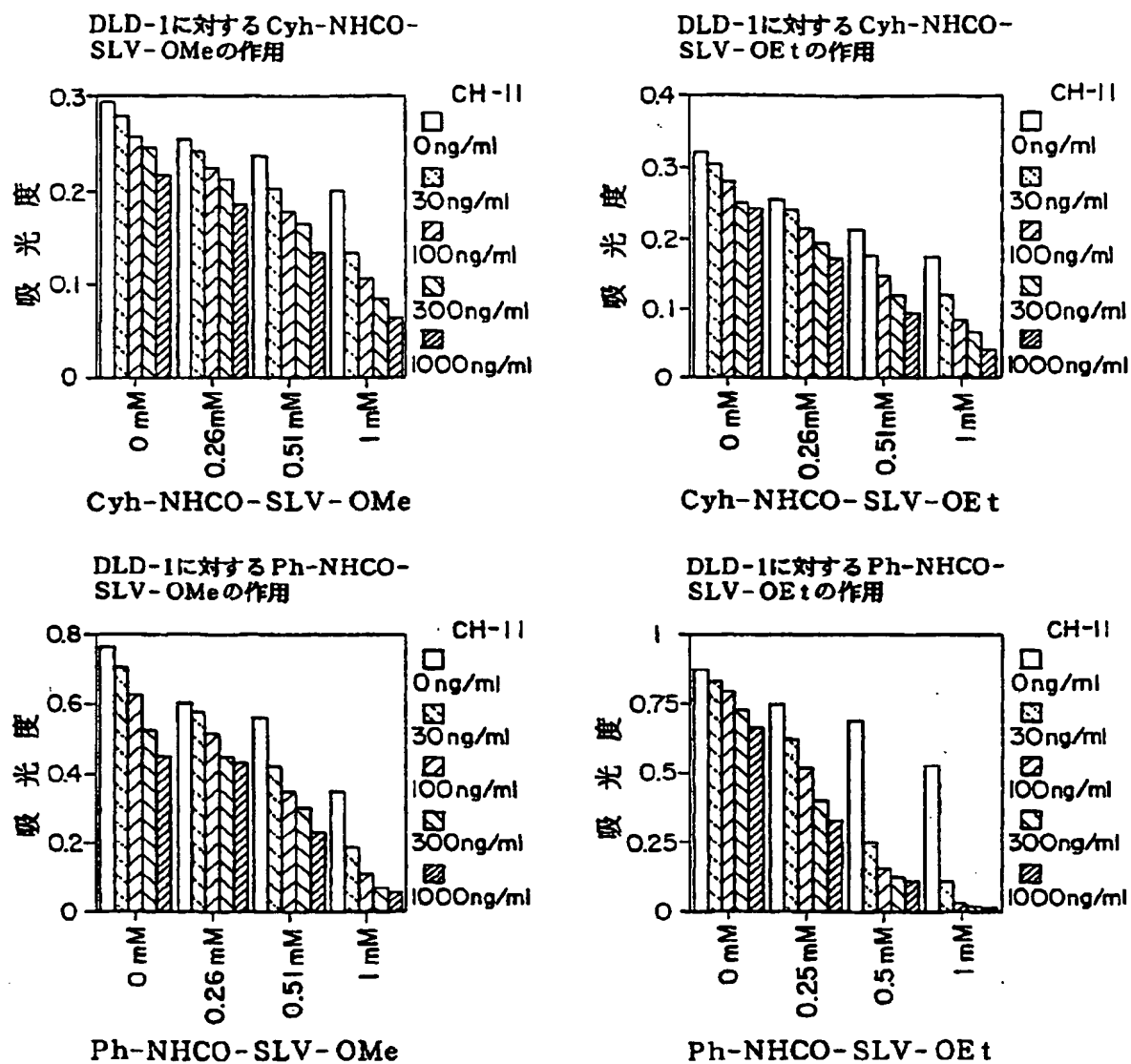
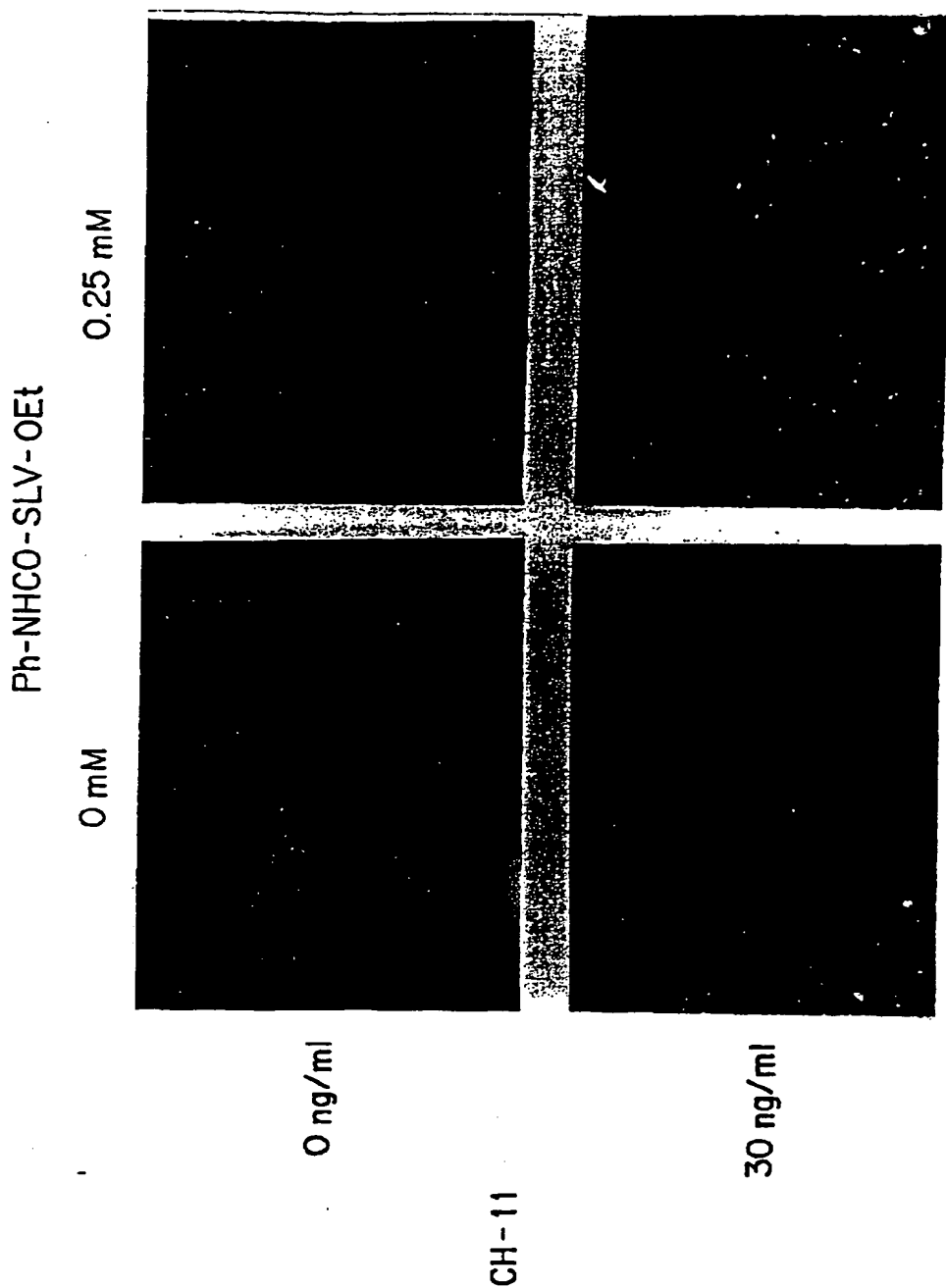


FIG. 10



【図 11】

[Figure 11]



【図 1 2】

[Figure 12]

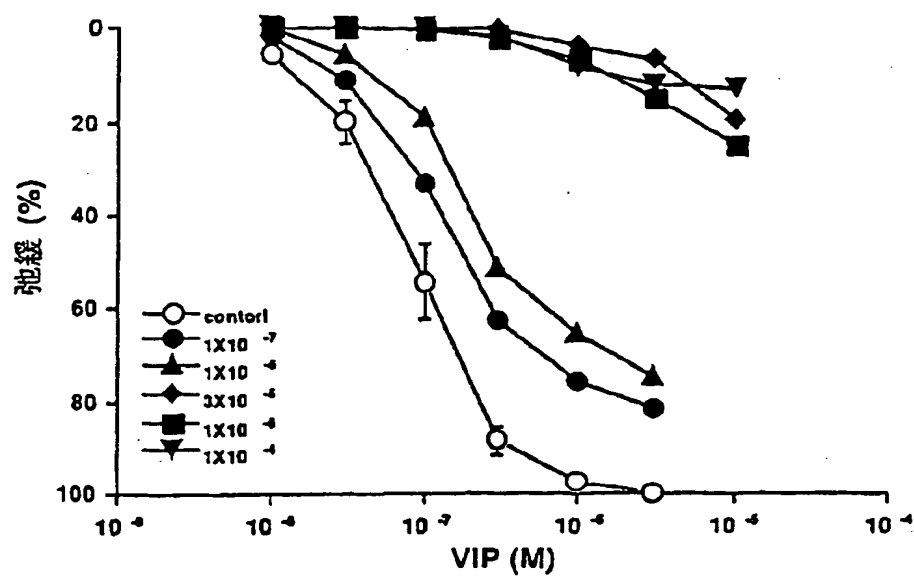


FIG. 12

【図 1 3】

[Figure 13]

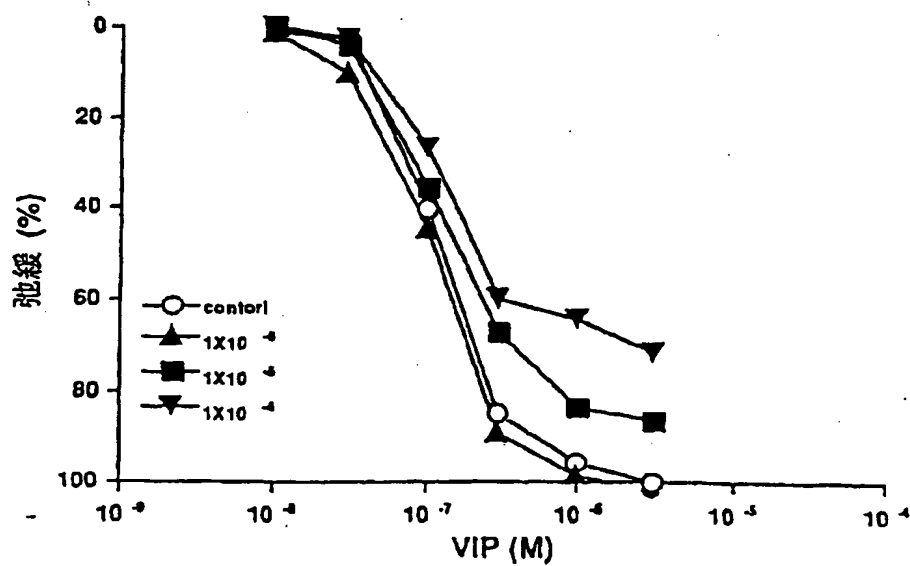


FIG. 13

【図 14】

[Figure 14]

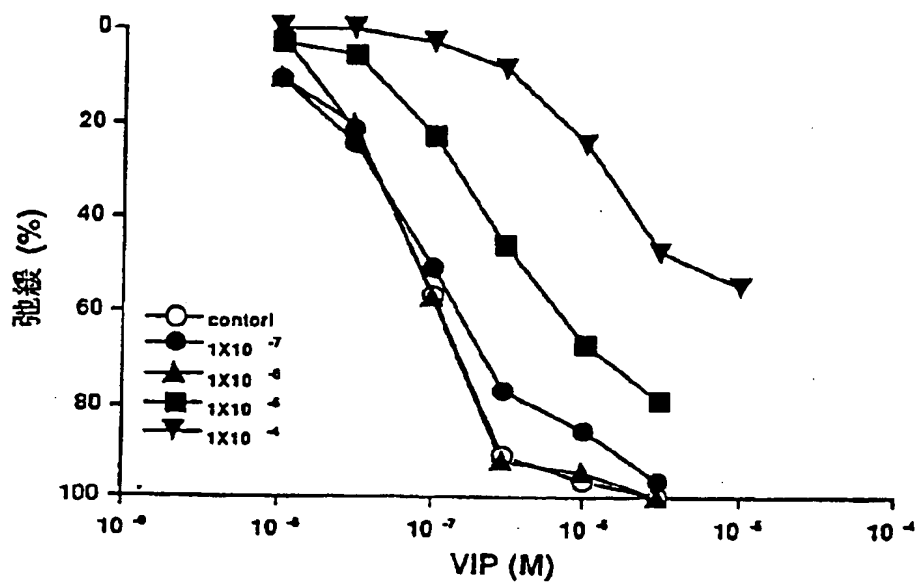


FIG. 14

【図 15】

[Figure 15]

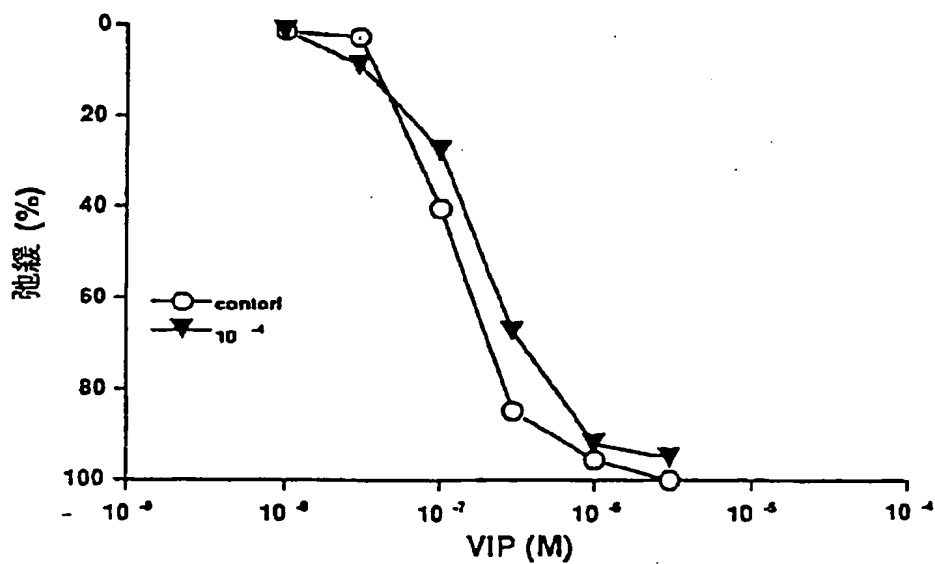


FIG. 15

【図 16】

[Figure 16]

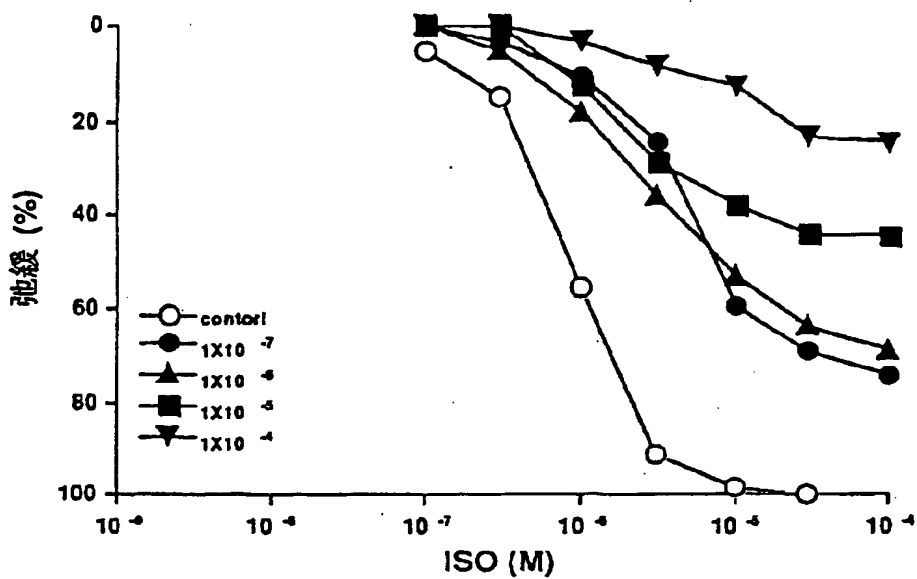


FIG. 16

【図 17】

[Figure 17]

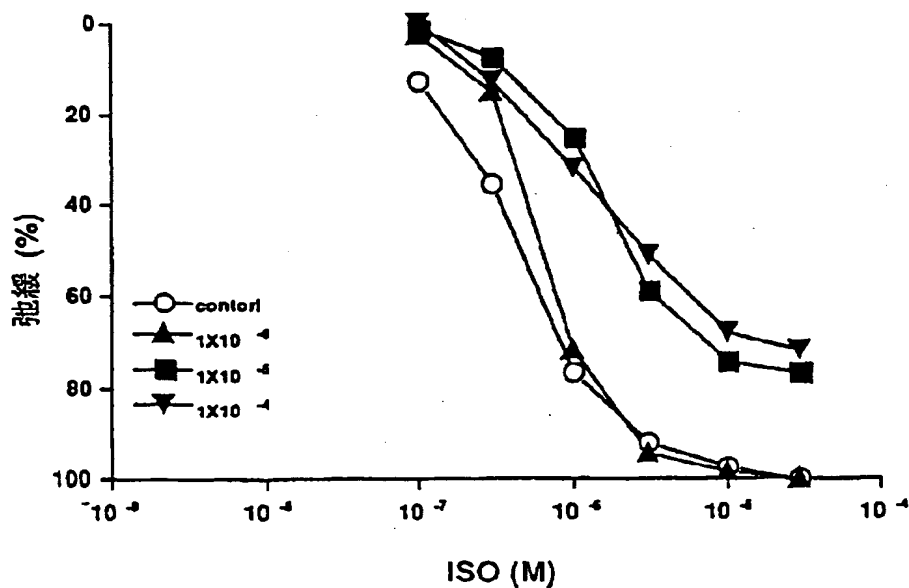
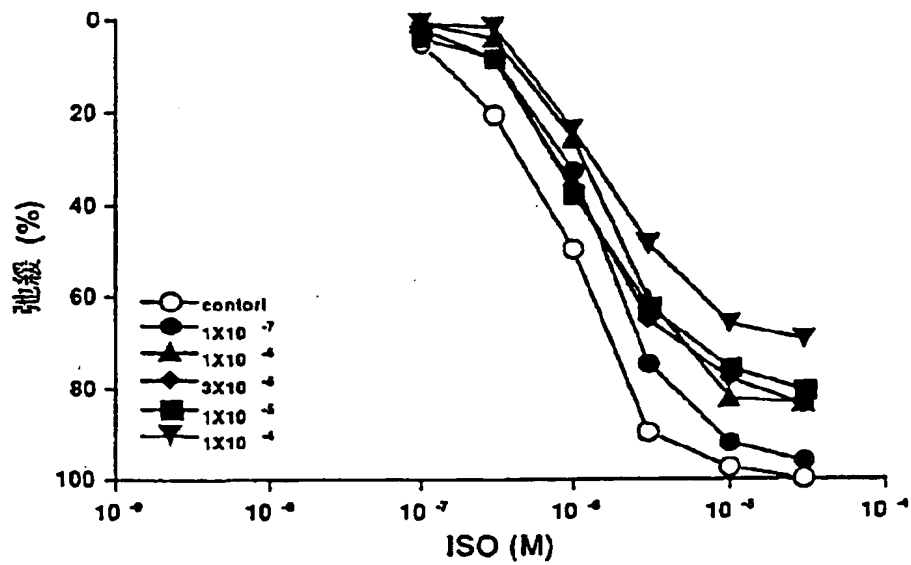


FIG. 17

【図 18】

[Figure 18]



F I G. 18

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/02697

<b>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</b> Int. Cl <sup>1</sup> C 07 K 5 / 06 2, 14 / 70 5, 14 / 71 5, A 61 K 38 / 03, 38 / 06, 38 / 17, G 01 N 33 / 68		
<b>B. 調査を行った分野</b> 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>1</sup> C 07 K 5 / 06 2, 14 / 70 5, 14 / 71 5, A 61 K 38 / 03, 38 / 06, 38 / 17, G 01 N 33 / 68		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAS ONLINE		
<b>C. 関連すると認められる文献</b>		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	SATO, T. et al., FAP-1: A Protein Tyrosine Phosphatase That Associates with Fas.,	17-27, 30, 33-39
X	Science, April 1995, Vol. 268, p. 411-p. 415 (特に、p. 412 Fig. 2. Amino acid sequence (h))	1-16, 28, 29, 31, 32, 40, 41
A	ITO, N. et al., The Polypeptide Encoded by the cDNA for Human Cell Surface Antigen Fas Can Mediate Apoptosis.,	1-32, 36, 37, 40, 41
A	Cell, 1991, Vol. 66, p. 233-p. 243 ITO, N. et al., A Novel Protein Domain Required for Apoptosis. Mutational Analysis of Human Fas Antigen.,	1-32, 36, 37, 40, 41
	J. Biol. Chem., 1993, Vol. 268, No. 15, p. 10932-p. 10937	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 29. 11. 96		国際調査報告の発送日 10.12.96
国際調査機関の名称及び先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 松岡 嘉彦 印 電話番号 03-3561-1101 内線 3444

様式PCT/ISA/210 (第2ページ) (1992年7月)

 ISTA's Paterra(tm), Version 1.5 (There may be errors in the above translation. ISTA cannot be held liable for any detriment from its use. WWW: <http://www.intlscience.com> Tel: 800-430-5727)

P.94



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/02897

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	LABURTHE, M. and COUVINEAU, A., Molecular Analysis of Vasoactive Intestinal Peptide Receptors. A Comparison with Receptors for VIP-Related Peptides.. Ann. New York Acad. Sci., 1988, Vol. 527, p. 296-p. 313	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	SREEDHARAN, S. P. et al., Structure, expression, and chromosomal localization of the type I human vasoactive intestinal peptide receptor gene.. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, March 1995, Vol. 92, p. 2939-p. 2943	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	SREEDHARAN, S. P. et al., Cloning and functional expression of a human neuroendocrine vasoactive intestinal peptide receptor., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1993, Vol. 193, p. 546-p. 553	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	SVOBODA, M. et al., Molecular cloning and functional characterization of a human VIP receptor from SUP-T1 lymphoblasts., Biochem. Biophys. Res. Commun., 1994, Vol. 205, p. 1617-p. 1624	1-30, 33, 36, 37, 40, 41
A	MUENCH, G. et al., Multisite contacts involved in coupling of the $\beta$ -adrenergic receptor with the stimulatory guanine-nucleotide-binding regulatory protein., Eur. J. Biochem., 1991, Vol. 198, p. 357-p. 364	1-30, 34, 36, 39-41
A	PALM, D., et al., Identification of a Gs-protein coupling domain to the $\beta$ -adrenoceptor using site-specific synthetic peptide., FEBS lett., 1990, Vol. 261, No. 2, p. 294-p. 298	1-30, 34, 36, 39-41
A	SCHOFIELD, P. R. et al., Primary structure of the human beta-adrenergic receptor gene., Nucleic Acids Res., 1987, Vol. 15, p. 3636	1-30, 34, 36, 39-41
PA	PRADO, G. N. et al., Role of the C Terminus of the Interleukin 8 Receptor in Signal Transduction and Internalization., J. Biol. Chem., August 1996, Vol. 271, No. 32, p. 19186-p. 19190	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
PA	RICHARDSON, R. M. et al., Regulation of Human Interleukin-8 Receptor A: Identification of a Phosphorylation Site Involved in Modulating Receptor Function., Biochemistry, October 1995, Vol. 34, p. 14198-p. 14201	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
A	HOLMES, V. E. et al., Structure and Functional Expression of a Human Interleukin-8 Receptor., Science, 1991, Vol. 253, p. 1278-p. 1280	1-30, 35, 36, 38, 40, 41
A	MURPHY, P. M. et al., Cloning of Complementary DNA Encoding a Functional Human Interleukin-8 Receptor., Science, 1991, Vol. 253, p. 1280-p. 1283	1-30, 35, 36, 38, 40, 41

様式 PCT/ISA/210 (第2ページの続き) (1992年7月)





## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/02697

## 第 I 欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第 1 ページの 1 の続き)

法第 8 条第 3 項 (PCT 17 条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 4 2, 4 3 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 は、治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであるから、PCT 17 条(2)(a)(i) 及び PCT 規則 39.1(iv) の規定により、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第 2 文及び第 3 文の規定に従って記載されていない。

## 第 II 欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第 1 ページの 2 の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部ののみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

様式 PCT/ISA/210 (第 1 ページの続表 (1)) (1992 年 7 月)

ISTA's Paterra(tm), Version 1.5 (There may be errors in the above translation. ISTA cannot be held liable for any detriment from its use. WWW: <http://www.intlscience.com> Tel:800-430-5727)

---

 フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6 識別記号  
 F I  
 A 6 1 K 38/17  
 G 0 1 N 33/68

(81) 指定国 EP (AT, BE, CH, DE, D K, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, S N, TD, TG), AP (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, B A, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, L C, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, T M, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN

(72) 発明者 澤 英治 群馬県高崎市宮原町  
 3 番地 麒麟麦酒株式 会社医薬探索研究所  
 内

(72) 発明者 上正原 勝 群馬県高崎市宮原  
 町 3 番地 麒麟麦酒株式 会社医薬探索研究  
 所内 (注) この公表は、国際事務局 (WIPO) により  
 国際公開された公報を基に作成したものである。な  
 おこの公表に係る日本語特許出願 (日本語実用新案登録  
 出願) の国際公開の効果は、特許法第 184 条の 10 第  
 1 項 (実用新案法第 48 条の 13 第 2 項) により生ずる  
 ものであり、本掲載とは関係ありません。

Continuation of

front page

(51) International Class 6 identification  
 FI A61K 38/17  
 G01N 33/68

(81) Designated State EP (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, G B, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), UA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, U.S. Patent, UZ, VN

(72) Inventor Inside of Sawa Hideharu Gumma Prefe  
 ctore Takasaki City Miyahara town No. 3 Kirin Brewery Co.,  
 Ltd. pharmaceutical exploratory research place

(72) Inventor This publication of (Note) inside upper correc  
 t field victory Gumma Prefecture Takasaki City  
 Miyahara town No. 3 Kirin Brewery Co., Ltd. pharmaceutical  
 exploratory research place is something which was drawn up on  
 the basis of disclosure which International Patent Publication is  
 done with International Bureau (WIPO). Furthermore as for  
 effect of International Patent Publication of Japanese language  
 patent application (Japanese language utility model registration  
 application) which relates to this publication, being something  
 which it occurs due to the 10 Section 1 (Section 13(2) of  
 Utility Model Law Article 48) of Japan Patent Law Article  
 184, this publication there is not a relationship.